

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 538

TITRE DE LA THÈSE

Applications des méthodes de fluorescence
et d'immuno-fluorescence au diagnostic direct
et au diagnostic sérologique de la Toxoplasmose
(à propos de 2406 examens)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON
le 22 Novembre 1967

par

Madame André CORNET, née RIGAUD
née le 15 Février 1939
à MANTES-LA-JOLIE (Yvelines)

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MÉDICALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1901 - N° 533



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 538

TITRE DE LA THÈSE

Applications des méthodes de fluorescence
et d'immuno-fluorescence au diagnostic direct
et au diagnostic sérologique de la Toxoplasmose
(à propos de 2406 examens)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON
le 22 Novembre 1967
par

Madame André CORNET, née RIGAUD
née le 15 Février 1939
à MANTES-LA-JOLIE (Yvelines)

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen Honoraire

M. H. HERMANN
Correspondant de l'Institut

Doyen

Mr. J. F. CIER

Assesseurs

Mr. M. LEVRAT
Mr. J. DORCHE

Conseiller Administratif

Mr. H. PRUVOST

Professeurs Honoraires

Mrs. TRILLAT - GARIN -
GATE - MARTIN - GABRIEL
LE - SANTY - DUCLOS -
GUILLEMINET - HERMANN -
ROCHET - POLOSSON -
ENSELME - WERTHEIMER -
SARROUY - BANSSILLON -
DECHAUME - LACROIX

PROFESSEURS

Messieurs

J. CIBERT	Clinique Urologique
P. PONTUS	Physique Biologique (Détaché à Beyrouth)
M. CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
R. FROMENT	Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique Médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacie Galénique
H. PIGEAUD	Clinique Obstétricale
J. BOURRET	Médecine du Travail
M. LEVRAT	Clinique Médicale A
R. SOHIER	Bactériologie - Virologie - Immunologie
G. NETIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie Analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique
P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie
L. PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
H. THIERS	Clinique Dermatologique, Syphiligraphie et Allergologie
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSEL	Clinique Chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique Carcinologique
M. BERGER (1)	Physique Nucléaire appliquée à la Médecine.
A. GUICHARD	Anatomie pathologique
P. GIRARD	Clinique Neuro-Psychiatrique et d'Hygiène mentale
M. GIRARD	Clinique Médicale D
M. LATARJET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique Chirurgicale B
A. VACHON	Pathologie Médicale
P. GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires

J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du Premier âge
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique Médicale Infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique Endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie Générale et Pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de Chirurgie Orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique Stomatologique
J. MARION	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie Infantiles
J. DORCHE	Matière Médicale et Législation Pharmaceutique
L. MANSUY	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Neurochirurgie
H. LIARAS (1)	Clinique Chirurgicale propédeutique
L. PERROT	Chimie
J. F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
P. GOINARD (1)	Clinique Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie Expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de Chirurgie Cardiaque
M. PONT (1)	Médecine Générale
J. TRAEGER	Clinique de Néphrologie et maladies métaboliques.
J. MATHIEU	Clinique Gynécologique
G. FAUCON	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des Maladies Infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie, Thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
D. VINCENT	Biochimie Appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie Biologique et Médicale
P. MAGNIN	Physiologie et Pathologie Obstétricales
J. THIVOLET	Hygiène et Action Sanitaire et Sociale
M. PLAUCHU (1)	Médecine Générale
J. FRANCILLON	Séméiologie Chirurgicale
C. GIROD	Histologie et Embryologie
X	Pathologie Chirurgicale
X	Pathologie Générale et Expérimentale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Messieurs

E. ROMAN	Parasitologie
J. FEROLDI	Anatomie pathologique
R. MORET	Physique biologique
L. ODDOUX	Botanique et Cryptogamie
C. DESPIERRES	Médecine Générale
J. P. GARIN	Parasitologie
F. TOLOT	Médecine du Travail
R. MALLEIN	Chimie analytique
E. PINET	Electro-radiologie
D. COLOMB	Dermatologie
R. FRANCOIS	Pédiatrie
M. COLIN	Médecine Légale
F. LARBRE	Pédiatrie
J. GRAS	Chimie biologique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Messieurs

R. CREYSSEL	Chimie biologique
J. GUYOTAT	Neuro-Psychiatrie
J. DESCOTES	Chirurgie Générale
M. JOUVET	Pathologie expérimentale
R. MORNEX	Médecine Générale
J. O. PEYRIN	Physique Biologique
M. TOMMASI	Anatomie Pathologique
P. BUFFARD	Electro-radiologie
E. LEJEUNE	Médecine Générale et Thérapeutique
Fr. de MOURGUES	Stomatologie
H. NAUSSAC	Maladies infectieuses
J. REBOUILLAT	Chirurgie Générale
G. ROMAGNY	Pédiatrie
J. P. DELAHAYE	Médecine Générale
R. DELEUZE	Anesthésiologie
M. GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique

R. TOURAINE	Pneumo-phtisiologie
A. BEL	Médecine Générale et Thérapeutique
F. CHARVET	Gynécologie-Obstétrique
M. MAYER	Cancérologie
G. BRAILLON	Anatomie et Chirurgie Générale
H. VILLIERS	Chirurgie Générale
P. LOUISOT	Chimie biologique et chimie des
.	Explorations fonctionnelles
J. COURJON	Neuro-psychiatrie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Messieurs

J. FAVRE-GILLY	Hématologie
G. RIFFAT	Hygiène
M. ROLLET	Pharmacie Galénique
C. BIZOLLON	Physique

AGREGES EN EXERCICE

Messieurs

A. NOTTER	Gynécologie Obstétricale
M. DUMONT	Obstétrique
B. SCHOTT	Neuro-psychiatrie
M. DEVIC	Médecine Générale
R. HUGONNIER	Ophthalmologie
G. ALLEGRE	Neuro-chirurgie
A. GARDE	Médecine Générale
R. FAYASSE	Orthopédie
J. GAILLAURD	Oto-rhino-laryngologie
A. PERRIN	Médecine générale
J. NORMAND	Médecine Générale
A. MOUNIER-KUHN	Chirurgie générale
J. L. CHASSARD	Electro-radiologie
R. GARMIER	Obstétrique

A. MICHEL	Anesthésiologie
J. MICHOUPLIER	Chirurgie Générale
R. LAMBERT	Médecine Générale
D. FRIES	Médecine Générale
R. GILLY	Pédiatrie
J. ROBERT	Médecine Générale
A. BOUCHET	Anatomie
M. BETHENOD	Pédiatrie
D. GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
J. C. KALB	Pneumo-phtisiologie
J. SOUSTELLE	Chirurgie Générale
J. J. VIALA	Médecine Générale
P. VINCENT	Bactériologie, Parasitologie, Virologie
J. A. BERTRAND	Chimie biologique
G. MARET	Chirurgie générale
J. VIALIER-RAYNARD	Bactériologie
L. C. CHOLLAT	Electro-radiologie
J. FLEURETTE	Bactériologie
R. FLANDROIS	Physiologie
P. MOREL	Hématologie
H. TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
A. FREDERICH	Pharmacologie
M. DAUDET	Chirurgie Infantile
J. BRUNE	Médecine générale et Thérapeutique
R. LOMBARD-PLATET	Chirurgie Générale
M. BOUVIER	Rhumatologie
F. FREYCON	Pédiatrie
C. LAPRAS	Neuro-chirurgie
M. PELLET	Physiologie
J. DUQUESNEL	Electro-radiologie
H. DEJOUR	Orthopédie et traumatologie
G. MOULIN	Dermato-Vénérologie
M. PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phtisiologie
P. PALIARD	Médecine Générale et Thérapeutique
A. MORGON	Oto-Rhino-Laryngologie
M. PAUPERT-RAVAULT	Ophtalmologie
J. MOTIN	Anesthésiologie
J. PASQUIER	Médecine Générale et Thérapeutique
J. L. VAUZELLE	Anatomie pathologique
J. C. CZYBA	Histologie et embryologie
M. CABANAC	Physiologie

J. SCHNEPP
G. NOEL

Orthopédie
Médecine Générale

EXAMINATEURS DE LA THESE

PRESIDENT : Mr. le Professeur J. COUDERT

ASSESSEURS : Mrs.
A. BADINAND
J. DORCHE
J. P. GARIN

A MES PARENTS

Ce travail est le résultat des sacrifices
qu'ils ont consentis. Qu'il soit le témoi-
gnage de notre amour filial et de notre
tendresse.

A MON MARI

Avec tout mon amour

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. COUDERT
Professeur de Parasitologie et de Pathologie exotique
à la Faculté de Médecine de Lyon
Biologiste des Hôpitaux

Il nous a accueilli avec bienveillance dans son Laboratoire. Nous le remercions vivement de la confiance qu'il a bien voulu nous témoigner en nous accordant une place dans son équipe.

Sa compétence, son extrême délicatesse et sa gentillesse ont été pour nous un grand réconfort, un exemple et un encouragement.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance, l'assurance de notre profonde gratitude et de notre entier dévouement.

A NOS JUGES,

Monsieur le Professeur A. BADINAND

Professeur de Chimie Analytique phramaceutique

Au cours des semestres d'Interne
passés dans son service, nous avons
pu profiterpleinement de l'étendue de
ses connaissances et apprécier sa
grande bienveillance et son savoir.

Il nous fait l'honneur de bien vouloir
juger ce travail. Qu'il nous soit
permis de lui exprimer notre pro-
fonde admiration et notre respectueuse
gratitude.

Monsieur le Professeur J. DORCHE
Professeur de matière médicale et Législation
Pharmaceutique -

Etudiante, nous avons apprécié la
clarté de son enseignement. Il nous
a toujours accueilli avec une extrême
bienveillance et une grande patience.

En maintes circonstances il nous a
aidé de ses conseils clairvoyants
avec simplicité.

Nous sommes heureuse et honorée
qu'il siége dans notre jury pour
juger notre travail.

Qu'il veuille bien accepter l'expression
de notre gratitude et notre dévouement.

Monsieur le Professeur J. P. GARIN
Professeur sans chaire de Parasitologie et de
Pathologie Exotique à la Faculté de Médecine de Lyon
Biologiste des Hôpitaux

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse
qui lui tient particulièrement à cœur.
Nous sommes profondément honorée de
cette marque de confiance. Il a su nous
faire partager son enthousiasme et son
amour du travail.

Il nous a guidé et encouragé tout au
long de nos recherches avec la sim-
plicité, la clarté, et l'efficacité qui
le caractérisent.

Qu'il veuille bien trouver ici nos re-
merciements émus, notre profonde
admiration et tout notre dévouement.

A Monsieur le Professeur P. MAGNIN
Gynécologue Accoucheur des Hôpitaux

Il a bien voulu nous permettre de
commencer une enquête épidémio-
logique dans le cadre de son service
à l'Hôpital de la Croix-Rousse.

Qu'il veuille bien trouver ici
l'assurance de notre profonde
gratitude.

A Monsieur le Professeur A. BERTOYE
Médecin des Hôpitaux

Nous avons toujours été très sensible
à sa bienveillante simplicité, et nous
devons à son indulgence de pouvoir
continuer à suivre notre travail dans
le cadre de son service à l'Hôpital
de la Croix-Rousse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de notre reconnaissance et de tout
notre dévouement.

A Monsieur le Docteur P. AMBROISE-THOMAS

Assistant au Laboratoire de Parasitologie et Pathologie
exotique de la Faculté de Médecine de Lyon

Il nous a guidé pas à pas dans l'élaboration de ce travail avec une grande patience.

Nous avons pu bénéficier de ses connaissances, apprécier sa compréhension et son esprit d'initiative.

Qu'ils sache toute la respectueuse admiration que nous avons pour lui, et la gratitude que nous éprouvons pour la sympathie qu'il nous a témoignée.

A Monsieur le Docteur J. DESPEIGNES

Assistant au Laboratoire de Parasitologie et Pathologie
exotique de la Faculté de Médecine de Lyon

Qui a réalisé le Test de Lyse et a bien voulu nous faire bénéficier de son expérience de la Toxoplasmose.

Qu'il trouve ici toute notre sympathie.

A Monsieur le Docteur KIEN TRUONG Thai

Assistant au Laboratoire de Parasitologie et Pathologie
exotique de la Faculté de Médecine de Lyon

Qui, avec sa souriante gentillesse et sa patience, a bien voulu nous faire bénéficier de son expérience.

Nous le remercions bien vivement et l'assurons de notre amitié.

A L'ENSEMBLE DE L'EQUIPE DU LABORATOIRE
DE PARASITOLOGIE ET DE PATHOLOGIE EXOTIQUE
DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

et particulièrement à

- Madame SIMON
pour toute la gentillesse avec laquelle
elle nous a fait bénéficier de sa grande
expérience du laboratoire
- Monsieur le Professeur ROMAN
- Melle le Docteur BATTESTI M. R.
- Melle le Docteur MICHEL-BRUN J.
- Monsieur le Docteur LU HUYNH THANH
- Melle LOGNOS

A la petite équipe d'Immuno-fluorescence :

- Madame M. MINJAT
- Monsieur le Docteur M. A. POTHIER
- Monsieur le Docteur J. P. GEORGET
- Madame C. LIOU
- Madame M. TROUSSEAU

Nous remercions également Mesdames

MANCHET
MARET
PRUVOT

de l'Institut Pasteur, qui ont bien voulu nous
aider de leurs conseils à propos de la fabri-
cation du conjugué.

Qu'il nous soit permis de remercier également

Melle G. COUDER

Infirmière à l'Hôpital de la Croix-Rousse

Qui nous a apporté une aide très
précieuse tout au long de ce
travail avec sa gentillesse et
son efficacité habituelle.

A MES CAMARADES DE L'INTERNAT EN
PHARMACIE DES HOPITAUX DE LYON

A TOUS MES AMIS

PLAN

INTRODUCTION

DIAGNOSTIC DIRECT DE LA TOXOPLASMOSE par l'utilisation
de substances fluorescentes ou par la Technique d'Immuno-
fluorescence.

I - Par l'utilisation de substances fluorescentes - Déméthyl-
chlortétracycline -

a) Expérimentation in vitro

b) Expérimentation in vivo

c) Résultats obtenus :

- Efficacité thérapeutique de la D. M. C. T.
- Intérêt comme moyen de repérage des
Toxoplasmes.
- Mode d'action

II - Par la technique d'Immuno-fluorescence

A/ Principe de la Réaction

B/ Les éléments de la réaction

- Différents types de préparations
utilisées
- Le conjugué
- La contre-coloration

C/ Mode opératoire

D/ Résultats

II

DIAGNOSTIC INDIRECT

A - Essais d'amélioration de la technique

I - L'antigène

a) Origine

- . Ascite de souris toxoplasmiques
- . Ascite de Cotton-rat
- . Cultures cellulaires

b) Préparation de l'antigène

- . Etalements secs sur lame
- . Coupes à la congélation

c) Conservation

II - Les sérums étudiés

- Conservation
- Dilutions étudiées

III - Le conjugué

- Conservation
- Conditions d'utilisation
 - . "Témoin conjugué seul"
 - . Dilutions étudiées

IV - Contre-coloration

V - Installation microscopique

VI - Technique proposée

- 1) Préparation de l'antigène
- 2) Action des sérums étudiés
- 3) Lavage
- 4) Action du conjugué + Bleu Evans
- 5) Lavage
- 6) Examen en lumière ultra-violette

III

VII - Lecture des Résultats

B - Résultats

I - Etude de la valeur de la réaction d'Immuno-Fluorescence

- 1) Comparaison Immuno-fluorescence (I.F.)
Test de Lyse (T. L. T.) au cours de la
Toxoplasmose expérimentale des cobayes.
- 2) Comparaison I.F. et T. L. T. à propos
de 1016 sérums humains.

II - Enquête sérologique effectuée sur 1390 sérums prélevés à la Maternité de l'Hôpital de la Croix- Rousse.

RESUME

CONCLUSIONS

INTRODUCTION

Parmi les sujets d'actualité de la Toxoplasmose et, parmi ceux qui ont été abordés à Lyon en matière de Toxoplasmose, en raison de la fréquence de leurs formes cliniques il est apparu que deux sujets intéressent particulièrement le clinicien :

- le diagnostic direct de la Toxoplasmose chez l'homme et,
- le dépistage précoce de la Toxoplasmose au cours de la grossesse.

Dans le cas de la Toxoplasmose ganglionnaire, la preuve de l'affection est apportée soit par la découverte cytologique sur l'adénogramme effectué sur une ponction ganglionnaire, ou par la découverte de toxoplasmes sur une biopsie par l'examen anatomo-pathologique. Dans tous les autres cas on ne peut faire appel qu'aux méthodes indirectes : ce sont les diverses réactions sérologiques et particulièrement le test de Lyse de SABIN et FELDMAN modifié en France par DESMONTS.

Chacun de ces procédés diagnostics entraîne malheureusement de nombreuses difficultés pratiques. En effet, l'examen anatomo-pathologique, qu'il porte sur des coupes histologiques ou sur des étalements de sang ou de moelle ne montre que rarement des toxoplasmes sous leur forme typique en croissant.

L'examen anatomo-pathologique ne révèle sur des coupes que des images plus ou moins circulaires qui peuvent correspondre à des sections de parasites, mais qui sont quelquefois impossible à identifier de façon formelle.

L'inoculation de prélèvement à des animaux de laboratoire ne permet le diagnostic qu'après plusieurs jours. Pour donner des renseignements suffisamment précis, cette inoculation doit porter sur plusieurs animaux, dont il faut vérifier, par la sérologie, qu'ils sont indemnes de toxoplasmose avant l'inoculation. Dans certains cas les toxoplasmes ne sont pas retrouvés chez les animaux inoculés et le diagnostic ne peut être basé que sur des preuves indirectes fournies par l'apparition d'une sérologie positive chez la majorité des animaux inoculés.

Enfin, en ce qui concerne la sérologie, si le test de lyse demeure jusqu'ici la méthode de référence, cette technique suppose l'entretien régulier d'une souche vivante de toxoplasmes et surtout, l'utilisation de facteur accessoire dont la rareté explique le nombre assez restreint de laboratoires, qui, en France pratiquent le test de lyse.

Tout ceci nous a conduit à voir quelles améliorations pouvait apporter l'emploi de la technique de Fluorescence et d'Immuno-fluorescence pour le diagnostic direct et indirect de la Toxoplasmose.

En ce qui concerne l'Immuno-fluorescence, cette étude avait déjà été abordée à Lyon en 1963 par P. Ambroise-Thomas dans sa thèse. Nous avons repris et développé ce travail pour bien préciser, compte tenu de diverses améliorations matérielles et techniques, quel pouvait être l'intérêt pratique de cette méthode.

Pour le diagnostic direct de la Toxoplasmose, parmi les différents fluorochromes qui étaient à notre disposition, nous nous sommes d'abord orientés vers l'emploi de la Démethylchlortétracycline, pour "marquer" in vitro ou in vivo des toxoplasmes. En effet, ce produit constitue une thérapeutique active de la Toxoplasmose, et par ailleurs, puisque c'est une Tétracycline, il présente une fluorescence assez nette en lumière ultra-violette. Nous avons essayé de voir s'il ne se concentrerait pas électivement au niveau des toxoplasmes dont il pourrait faciliter le repérage.

Pour cela, nous avons étudié ses effets aussi bien sur des coupes ou des applications sur lame d'organes parasités qu'in vivo, en l'administrant à des animaux inoculés avec des toxoplasmes, chez lesquels nous avons ensuite tenté d'identifier les parasites par leur fluorescence. Par ailleurs, toujours en ce qui concerne le diagnostic direct, nous avons pu perfectionner la technique à "une couche" d'Immuno-fluorescence, et préciser son intérêt pratique.

Pour le diagnostic sérologique, nous avons amélioré la réaction d'Immuno-fluorescence, notamment en ce qui concerne les conditions de conservation de l'antigène, et surtout l'emploi de la contre coloration par le Bleu Evans. Cette technique a été comparée au test de lyse des toxoplasmes par l'étude de 1016 serums. Par la suite, nous l'avons appliquée au dépistage sérologique de la Toxoplasmose chez les femmes enceintes. Nous avons ainsi réalisé 1390 réactions dans le cadre de l'enquête sérologique organisée à l'Hôpital de la Croix-Rousse par notre Maître, le Professeur J. P. GARIN.

CHAPITRE I

DIAGNOSTIC DIRECT DE LA TOXOPLASMOSE PAR L'UTILISATION DE SUBSTANCES FLUORESCENTES OU PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE -

A l'heure actuelle, la forme la plus fréquente en matière de Toxoplasmose, est la lymphadénite toxoplasmique. Pour cette affection les moyens diagnostics sont plus souvent indirects. Ce sont :

- l'aspect de l'adénogramme et de l'hémogramme.
- la recherche des anticorps circulants par diverses méthodes sérologiques.

Tout ceci ne constitue cependant qu'un faisceau de preuves indirectes et la seule façon indiscutable d'affirmer le diagnostic reste la découverte du parasite.

Ce diagnostic direct peut être réalisé par l'examen de coupes histologiques pratiquées à partir de fragments biopsiques ou bien, en inoculant un lot de souris avec un broyat préparé à partir de ces biopsies.

Ces deux méthodes sont également aléatoires et ce n'est que difficilement que l'on peut réaliser le diagnostic direct de la Toxoplasmose. En effet,

- l'examen des coupes histologiques montre le plus souvent des images difficiles à interpréter, car les toxoplasmes ne sont que rarement coupés suivant leur grand axe, et sur les préparations, on ne trouve que des sections plus ou moins circulaires difficiles à identifier de façon formelle. Ceci explique que les toxoplasmes aient pu être confondus avec d'autres micro-organismes : champignons levuriformes (*Histoplasma*, *Cryptococcus*), avec les stades intracellulaires de divers flagellés (*Leishmania*), enfin, avec des Coccidies comme l'*Encéphalitozoon* ou les *Sarcocystis*. Cet exa-

men est difficile à interpréter. Il demande une lecture longue et attentive des lames et ne donne que rarement des résultats formels en dehors des aspects anatomo-pathologiques.

- Quant à l'inoculation aux souris, elle est, de technique et de réalisation plus difficile, mais ses résultats sont supérieurs à ceux de l'examen anatomo-pathologiques.

Il est nécessaire d'inoculer plusieurs animaux indemnes de Toxoplasmose.

L'inoculation est pratiquée avec le broyat d'un fragment biopsique (généralement un fragment ganglionnaire). Par la suite, on sacrifie les souris et on recherche les toxoplasmes dans le liquide d'ascite et sur les coupes histologiques de différents organes.

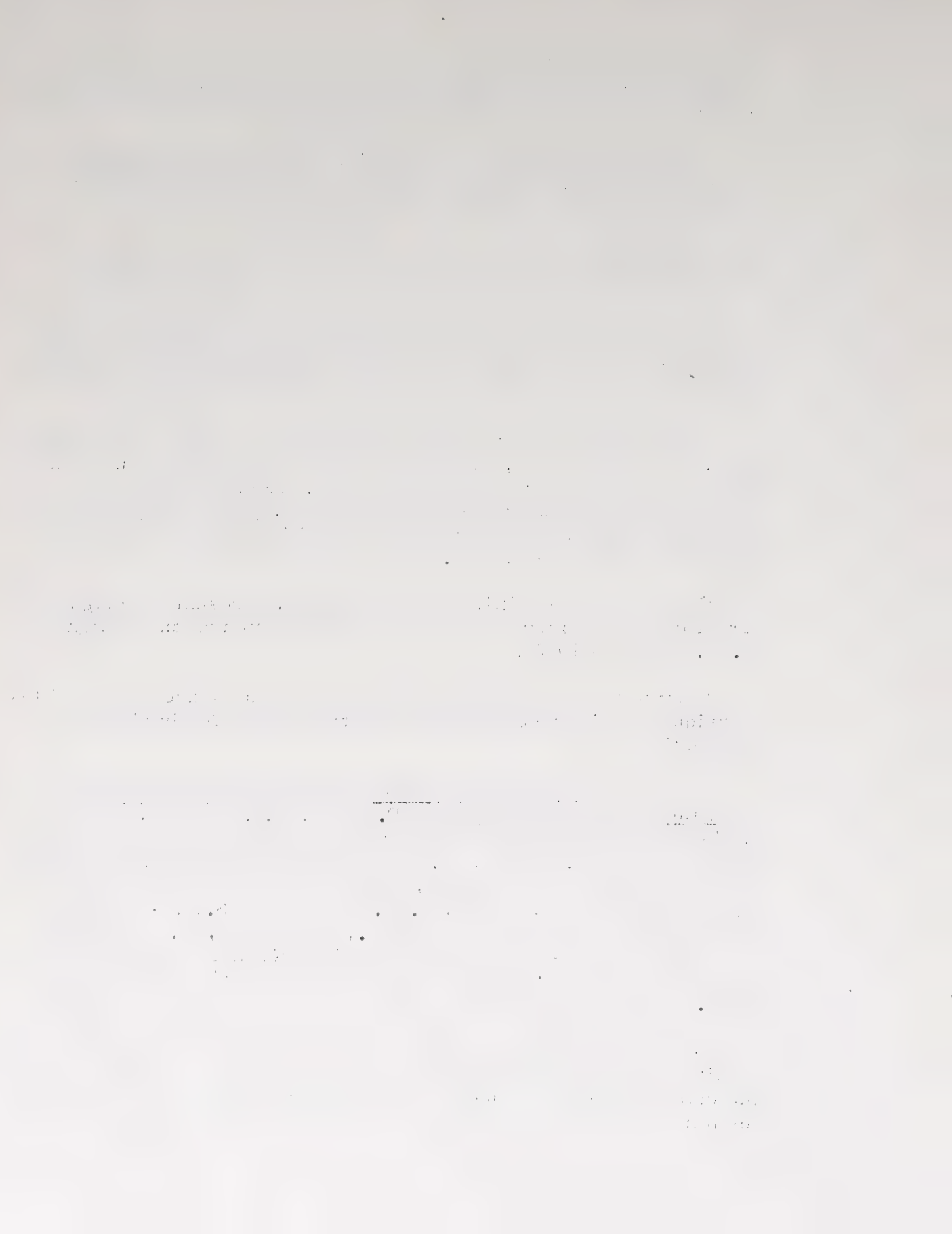
Cette recherche est souvent négative si la souche est peu pathogène, et on est conduit, en pratique, à recourir à des preuves indirectes en suivant la sérologie des souris. Le diagnostic de la Toxoplasmose est alors basé sur le fait que, pour la majorité des animaux inoculés, le Test de Lyse se positive vers le vingt et unième jour après l'inoculation.

On voit donc les difficultés multiples que présente le diagnostic direct de la Toxoplasmose que de nombreux auteurs ont soulignées. (J. P. GARIN - 1962).

Compte tenu de ces difficultés, nous avons essayé de voir si les techniques de fluorescence ne permettraient pas de simplifier ce diagnostic

- Nos premières recherches ont porté sur l'utilisation de la Déméthylchlorotétracycline (D. M. C. T.). En effet, cet antibiotique semble constituer une excellente thérapeutique de la Toxoplasmose - (J. P. GARIN, M. PERRIN-FAYOLLE et P. PALIARD, Février 1965) - et par ailleurs, notre attention a été attirée par diverses publications : (BERK, J. E. et KANTOR S.M. - 1962) ; HIDUCHENKO - 1965 - ; BARTHE J., MANCHET, P. PALIARD et Collaborateurs - 1965 -) signalant l'intérêt de la fluorescence obtenue par les Tétracyclines comme moyen de diagnostic cytologique.

Nous avons essayé d'utiliser la Demethylchlortétracycline pour faciliter le diagnostic direct de la Toxoplasmose, en considérant que cette substance risquait de se concentrer électivement au niveau des parasites et de leur donner une fluorescence jaune assez intense;



analogue à celle retrouvée avec les autres Tetracyclines.

- Par la suite, nous avons repris la technique d'Immuno-fluorescence suivant la méthode directe à une couche, dont nous avons voulu apprécier la valeur diagnostique en pratique. Cette méthode a été proposée pour la première fois il y a plus de dix ans (GOLDMAN - 1956-). Elle a été reprise au Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Exotique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon par P. AMBROISE-THOMAS - 1963 -.

Nous avons repris ces travaux pour déterminer, en pratique, la valeur de cette méthode, non seulement sur des étalements préparés à partir d'une suspension de Toxoplasmes, mais aussi avec des applications sur lame, ou des coupes à la congélation d'organes parasités.

I - UTILISATION DE LA DEMETHYLCHLORTETRACYCLINE COMME MOYEN D'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DES TOXOPLASMES.

Les travaux de BARTHE J., MANCHET, P. PALIARD et Coll. - 1965 - et de HIDUCHENKO - 1965 - ont fait état de l'importante fluorescence présentée par diverses tétracyclines et de l'utilisation possible de ces produits comme moyen de diagnostic. C'est ainsi que KLINGER et KATZ - 1960 - puis BERK J. E. et KANTOR S. M. - 1962 - ont montré que l'administration orale de Tétracycline à la dose totale de 3 grammes permet le diagnostic de cancer de l'estomac, les cellules cancéreuses recueillies par lavage gastrique étant fortement fluorescentes.

Dans le domaine de la Parasitologie, plusieurs auteurs, et notamment TOBIE J. E. et HENRY K. BEYE - 1960 - ont pu mettre en évidence des Filaires par administration de Tétracycline, les parasites présentant alors une vive fluorescence en lumière ultraviolette.

Par ailleurs, les travaux de J. P. GARIN, M. PERRIN-FAYOLLE et P. PALIARD - 1965 - ont montré que l'un de ces composés, la Déméthylchlortétracycline (D. M. C. T.) semble active face à la Toxoplasmose.

Nous avons donc utilisé ce produit dans deux buts :

1 - Voir si la D. M. C. T. pouvait être un "marqueur" des Toxoplasmes présents dans les tissus et faciliter le diagnostic direct de la Toxoplasmose.

2 - Essayer de déterminer les mécanismes de l'action parasiticide de la D. M. C. T. face aux toxoplasmes.

Emploi de la Demethylchlortétracycline comme moyen de diagnostic direct.

Nos essais ont porté successivement sur l'action in vitro et in vivo de ce produit.

a - Experimentation in vitro

Comme pour tout le reste de notre expérimentation nous avons utilisé des toxoplasmes de la souche Rh de Sabin, entretenus sur souris par inoculation intrapéritonéale, les passages s'effectuant tous les trois jours.

La D. M. T. C. a été employée sous forme d'une solution à 1 gr. de produit par litre dans de l'eau distillée, c'est à dire une solution à 1 mg/ml. A cette concentration la Mexocine est nettement fluorescente en lumière ultra-violette : nous avons en effet vérifié que cette fluorescence était perceptible jusqu'à une concentration de l'ordre de 0,05 mg/ml. Les toxoplasmes fraîchement prélevés dans du liquide d'ascite et lavés à une reprise dans du serum physiologique ont été répartis sur des lames microscopiques à raison d'une goutte de suspension de toxoplasmes par lame. La richesse en parasites était de l'ordre de 100 toxoplasmes, par champ microscopique avec un objectif de x20 et des oculaires x 8, 5.

Après séchage à la température du laboratoire ces étalements ont été recouverts d'une goutte de solution de D. M. C. T. et laissés incuber 5 minutes à 37 ° C. Les lames ont été alors lavées à deux reprises dans du serum physiologique, puis recouvertes d'une lamelle montée sur de la glycérine tamponnée à pH 7, 2.

A l'examen en lumière ultra-violette (Microscope Reichert Zetopan filtre d'émission BG 12/6 mm, filtre d'arrêt CG 9/1 mm et OG 1/1, 5 mm) les toxoplasmes ont présenté au cours de tous nos essais une fluorescence jaune assez vive.

En fonction de ces premières séries de résultats il semblait donc bien y avoir une fixation de la D. M. C. T. sur les parasites.

b - Expérimentation in vivo

Modes d'inoculation

Nos essais ont été réalisés sur des souris blanches inoculées par voie respiratoire ou intra-péritonéale.

. Inoculation respiratoire :

Cette technique fut déjà utilisée à Lyon par le Professeur J. P. GARIN. Les souris sont anesthésiées à l'éther sous une cloche en verre. Afin d'éviter une anesthésie trop profonde pouvant être mortelle, on place les animaux sur un plan incliné. L'anesthésie est considérée comme suffisante dès que les souris commencent à perdre l'équilibre et tombent.

On dépose alors deux gouttes d'une suspension de toxoplasmes sur chaque narine des animaux. Les parasites seront inhalés au cours de la respiration. L'anesthésie doit être suffisante pour éviter le rejet des toxoplasmes par éternuement.

Les toxoplasmes (souche Rh de Sabin) proviennent d'ascite de souris inoculées depuis trois jours. Ils sont numérisés à la cellule de Nageotte, en contraste de phase. Par dilution dans du serum physiologique on réalise une concentration d'environ 5000 toxoplasmes par ml, ce qui correspond à une inoculation d'environ 1000 toxoplasmes par souris, dose entraînant la mort de l'animal en 7 à 8 jours.

. Inoculation intra-péritonéale :

C'est le procédé le plus classique utilisé pour la conservation de la souche.

On inocule environ 300.000 toxoplasmes (ascite toxoplasmique diluée dans du serum physiologique). Cette dose amène la mort des souris en 4 à 5 jours avec un important épanchement péritonéal.

Administration de la Demethylchlortétracycline

La D. M. C. T. a été administrée par voie orale, à la seringue, en utilisant une aiguille à saphène légèrement courbée de manière à pouvoir être facilement introduite dans l'oesophage des animaux. Le renflement bulbaire que présente l'extrémité distale de cette aiguille permet de ne pas blesser les souris et facilite l'administration du produit, car il obture presque complètement les voies digestives supérieures. Ce procédé d'administration à la seringue nous semble plus précis que l'administration du produit mélangé aux aliments ; il est rapide, et l'on est sûr que la dose thérapeutique a bien été ingérée en totalité. Nous avons utilisé une solution de D. M. C. T. à 1 g/l dans de l'eau distillée ; la

posologie moyenne était, comme le conseillent J. P. GARIN, M. PERRIN-FAYOLLE et P. PALIARD - 1965 -, de 50 mg/kg de poids, soit 0,1 mg pour une souris de 20 g, ce qui correspond à 0,1 ml de notre solution.

La première administration du produit a eu lieu :

- le jour même de l'inoculation des toxoplasmes pour les animaux inoculés par voie intra-péritonéale.
- le lendemain de l'inoculation pour les souris infestées par voie nasale.

Ces doses ont été par la suite, répétées quotidiennement.

Matériel vivant utilisé

Nos essais ont porté sur cinq lots de dix animaux, avec chaque fois deux souris témoins non traitées ; ceci, aussi bien pour les souris inoculées par voie intra-péritonéale que par voie nasale. Au total nous avons donc étudié cent souris inoculées.

Le Contrôle des résultats

a été effectué de la façon suivante :

dans chaque lot d'animaux on a laissé évoluer la Toxoplasmose des souris témoins, les autres étant régulièrement sacrifiées à raison d'une souris par jour.

Pour les souris inoculées par voie nasale nous avons systématiquement prélevé les poumons.

Pour les animaux infestés par voie intra-péritonéale nous avons prélevé le foie, la rate et les reins, et effectué un lavage péritonéal soigneux de manière à retrouver les Toxoplasmes éventuellement présents dans la cavité péritonéale.

A partir des organes prélevés nous avons effectué des applications sur lame ou des coupes à la congélation de 5 microns d'épaisseur (Bright's cryostat).

Les préparations réalisées (application sur lame ou coupe à la congélation) ont été divisées en deux lots : le premier étant coloré au May-Grunewald-giemsa et examiné au microscope en lumière ordinaire, le deuxième, fixé à l'acétone pendant dix minutes étant examiné en lumière ultra-violette, après montage d'une lamelle sur une goutte de glycérine tamponnée.

A partir des liquides de lavages péritonéaux, des contrôles identiques ont été réalisés (coloration au May-Grunewald-giemsa

et examen en lumière ordinaire, on recherche une fluorescence jaune, due à la D. M. C. T., en microscopie ultra-violette)

c - Résultats

Efficacité thérapeutique de la Déméthylchlor-tétracycline

Nos divers essais nous ont permis de retrouver les conclusions de J. P. GARIN et M. PERRIN-FAYOLLE. En effet, la D. M. C. T. permet, chez les souris inoculées, une survie de huit jours au moins, alors que les animaux témoins meurent le troisième ou le quatrième jour, s'ils sont inoculés par voie intra-péritonéale, ou vers le septième, huitième jour après une inoculation par voie nasale.

En fait, les animaux traités présentent une véritable guérison mais dans les conditions de nos essais nous n'avons pas pu apprécier la survie au delà de huit jours puisque nous avons travaillé avec des lots comprenant deux souris témoins et huit souris traitées et sacrifiées quotidiennement. Cependant, cinq à six jours après l'inoculation, nous n'avons retrouvé aucun toxoplasme dans les organes examinés, ce qui semble bien confirmer la notion de guérison.

Nos résultats sont réunis dans les deux tableaux suivants :

Souris inoculées par voie intra-péritonéale : 5 lots de 10 animaux

2 souris témoins mortes en 4 jours avec
de nombreux toxoplasmes dans Ascite,
Foie,
Rate

	Ascite	Foie	Rate	Reins
S 1	0	-	-	-
S	+	+	0	0
S 3	++	+	0	0
S 4	++	+	+	0
S 5	+	+	0	0
S 6	0	0	0	0
S 7	0	0	0	0
S 8	0	0	0	0

Les souris sont sacrifiées à raison d'une par jour (S 1 = un jour après ; S 2 = deux jours après etc...)

Souris inoculées par voie nasale.

2 souris témoins mortes en 8 jours avec des toxoplasmes +++ dans les poumons.

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8
Pou- mons	0	0	+	+	++	+	0	0

Intérêt de la Déméthylchlortétracycline
comme moyen de repérage des Toxoplas-
mes dans les organes parasités

Les parasites ont été retrouvés dans :

- le liquide d'ascite
- les applications sur lame de foie, rate et poumon .
- les coupes à la congélation de foie , de rate ou de poumon .

. Sur les préparations colorées au May-Grunewald giemsa les toxoplasmes ont été assez facilement identifiés au moins en ce qui concerne les prélèvements effectués avant le quatrième jour. Passé ce délai, en effet, le nombre des parasites décroît très nettement, ce qui complique considérablement l'examen.

. Pour les préparations examinées directement en lumière ultra-violette nous n'avons pas observé de fluorescence nette au niveau des toxoplasmes. Leur repérage était d'ailleurs beaucoup plus délicat que sur les préparations colorées par les techniques courantes.

En outre, les préparations réalisées à partir d'organes parasités (application sur lame ou coupes à la congélation) sont riches en éléments non parasitaires possédant une importante auto-fluorescence, qui gêne l'identification des parasites dont la fluorescence est très faible.

Nous n'avons pas essayé d'améliorer ces résultats en contre colorant les lames par le Bleu Evans car les toxoplasmes présentaient une fluorescence extrêmement faible, très inférieure à l'auto-fluorescence des autres éléments présents dans les préparations. Dans ces conditions, la contre-coloration ne pouvait que faire disparaître la fluorescence des parasites bien avant que l'auto-fluorescence des coupes ne puisse être masquée.

L'administration de la D. M. C. T. par voie générale, n'est donc pas applicable au diagnostic direct de la toxoplasmose chez la souris. Les résultats décevants obtenus *in vivo*, chez l'animal, s'opposent aux observations faites *in vitro* sur des parasites mis en contact avec la D. M. C. T. Il est possible qu'*in vitro*, le contact soit suffisant pour produire une fixation du produit sur les parasites, et qu'au contraire, lorsque la D. M. C. T. est administrée *in vivo*, elle ne puisse pas s'accumuler sur les toxoplasmes, du moins à une concentration suffisante pour être décelée. Une autre hypothèse est que la D. M. C. T. n'agisse que par l'intermédiaire d'un de ses métabolites qui ne serait pas, lui, fluorescent en lumière ultra-violette.

Détermination du mode d'action de la Déméthylchlortétracycline

Etant donné l'absence de fluorescence au niveau des toxoplasmes, il nous a été impossible de préciser, par l'examen en lumière ultra-violette, le mode d'action de la D. M. C. T. Cette substance agit peut-être au niveau du noyau des parasites, c'est du moins l'une des hypothèses que l'on peut formuler, mais aucune observation personnelle ne nous a permis de l'étayer. Ceci demanderait une étude plus approfondie de la fluorescence des Tétracyclines et de leurs métabolites. Nous n'avons pas poussé plus loin nos recherches dans cette voie puisque le but de notre travail se limitait à l'intérêt des techniques de fluorescence pour le diagnostic pratique de la Toxoplasmose.

II - UTILISATION DE LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE POUR LE DIAGNOSTIC DIRECT DE LA TOXOPLASMOSE -

L'immuno-fluorescence a été pour la première fois appliquée au diagnostic direct de la Toxoplasmose par GOLDMAN - 1956 - Cet auteur avait utilisé aussi bien des suspensions de toxoplasmes que des coupes histologiques réalisées avec les méthodes habituelles d'inclusion. En 1963 cette question a été étudiée à nouveau par P. AMBROISE-THOMAS qui a pu retrouver les résultats de GOLDMAN en partant d'étalements de liquide d'ascite ou d'applications sur lamelles d'organes parasités, la méthode étant par contre en défaut avec des coupes histologiques.

Compte tenu des différents progrès matériels réalisés en matière d'immuno-fluorescence, nous avons repris cette étude pour préciser, en pratique la valeur diagnostique de l'Immuno-fluorescence.

Le principal intérêt de ce diagnostic direct réside dans l'identification des toxoplasmes, sur des coupes anatomo-pathologiques en particulier sur des coupes de ganglions, dans le cas de la Toxoplasmose ganglionnaire humaine. Faute d'avoir pu disposer de fragments biopsiques prélevés chez des malades nous avons limité nos essais à des animaux infestés expérimentalement.

Après avoir rappelé le principe de la méthode nous envisageons successivement :

- le principe de la réaction
- les éléments de la réaction,
- le mode opératoire,
- les résultats obtenus

A - PRINCIPE DE LA REACTION

La méthode directe d'immuno-fluorescence repose sur l'utilisation d'immuns serums antitoxoplasmiques qui sont conjugués à différentes substances fluorescentes : essentiellement l'Iso-thiocyanate de Fluoresceine. Ce conjugué se fixe électivement sur les toxoplasmes au niveau desquels il réalise une véritable coloration sélective visible en lumière ultra-violette.

En pratique, de nombreux éléments, sur les coupes histologiques présentent une auto-fluorescence qui gêne considérablement le repérage des toxoplasmes. Il est donc nécessaire de recourir à une contre-coloration qui est destinée à masquer cette auto-fluorescence.

B - LES ELEMENTS DE LA REACTION

Il s'agit essentiellement des différents types de préparation sur lesquelles on a tenté le repérage des toxoplasmes, du conjugué fluorescent utilisé et du contre-colorant destiné à masquer l'auto-fluorescence des tissus parasités.

I - Les différentes préparations utilisées

Il nous a été impossible de disposer de biopsie humaine effectuée chez des sujets toxoplasmiques. Nos essais ont donc été réalisés à partir de liquide d'ascite ou de différents organes d'animaux d'expérience inoculés suivant diverses voies.

1/ Le liquide d'ascite a constitué pour nous l'élément de référence puisqu'il permet d'obtenir de très nombreux toxoplasmes facilement identifiables.

Nous avons utilisé des souris ou des cotton-rats (*Sigmodon hispidus hispidus*) inoculés par voie intra-péritonéale avec environ 500.000 toxoplasmes.

Le liquide d'ascite est prélevé trois jours après l'inoculation et lavé à trois reprises dans du serum physiologique tamponné à pH 7,2 (1)

(1) Tampon pH 7,2 : ClNa	8,5 g.
Phosphate disodique	2,4 g.
2 H ₂ O	
Phosphate monosodique	0,3 g.
Eau distillée	1000

Par des centrifugations différentielles on élimine la plupart des cellules présentes dans l'exsudat de manière à obtenir une suspension toxoplasmique pratiquement pure. La concentration en toxoplasmes est ramenée à environ 200 parasites par champ avec un objectif x 20 et un oculaire x 8,5. On dépose une goutte de cette suspension sur des lames microscopiques qui sont laissées à la température ordinaire jusqu'à séchage complet.

Ces préparations peuvent être conservées pendant plusieurs semaines à + 4°C ce qui nous paraît comparable à une conservation à - 20°C;

Certains auteurs préconisent l'addition de 9 volumes de solution saline formolée à 1 % à un volume d'exsudat et laissent en contact trente minutes. - GOLDMAN, GORDON, CARVER - 1962 - STADTSBAEDER et collaborateurs - 1964 - . Nous n'avons pas utilisé, dans cette expérimentation ce procédé, la technique que nous employons permettant, sans addition de formol, une bonne conservation des parasites.

Pour vérifier la valeur de l'immuno-fluorescence comme moyen d'identification des sections de toxoplasmes, aussi bien que des parasites intacts, nous avons également préparé des coupes à la congélation en partant de liquide d'ascite.

Pour cela, l'exsudat péritonéal lavé dans une solution saline isotonique (serum physiologique) est placé dans un petit tube en verre d'environ 8 mm de diamètre. Après congélation à - 20° C on réchauffe superficiellement le tube (il suffit de le tenir en main pendant quelques instants), de manière à pouvoir démouler le cylindre d'ascite congelé.

On réalise alors des coupes à la congélation de 5 microns d'épaisseur. Ces coupes se fixent sur des lames microscopiques par simple apposition. L'adhérence des toxoplasmes à la lame est suffisante pour éviter un décollement des étalements après les différents temps de la réaction d'immuno-fluorescence.

Ces préparations nous ont permis de disposer de très nombreuses sections de toxoplasmes sans que l'observation en fluorescence puisse être gênée par des éléments non parasitaires, comme c'est le cas sur les coupes de tissus. Facilement repérables en lumière ordinaire, les toxoplasmes présentent pourtant certaines altérations (gonflement) dues à la congélation et à la coupe.

2 / Les organes parasités utilisés ont été :

- des poumons de souris inoculées par voie nasale depuis 7 jours.
- le foie, la rate, et les ganglions prévertébraux de souris inoculées par voie intra-péritonéale trois jours auparavant
- enfin, des ganglions inguinaux de cobayes inoculés par voie sous-cutanée.

Pour les souris

nous avons déjà précisé les conditions d'inoculation pratiquée par voie intra-péritonéale ou nasale. Après sacrifice des souris nous avons en partant des organes considérés (poumons ou foie, rate et ganglions prévertébraux, suivant les cas) réalisé des applications sur lame ou des coupes à la congélation, ce qui nous semble préférable à la coupe de fragments inclus dans la paraffine suivant la technique de GOLDMAN - 1959 -

Ces coupes de 5 microns d'épaisseur sont réalisées avec un BRIGHT'S Cryostat. Les coupes peuvent être conservées à - 20° C ou l'on peut conserver le bloc et faire ensuite des coupes.

Chaque lot de ces préparations était divisé en deux séries dont l'une était colorée au May-Grunewald Giemsa et longuement examinée en lumière ordinaire pour vérifier la présence de Toxoplasmes.

Au total, nous avons inoculé 15 souris par voie intra-péritonéale et 15 autres par voie intra-nasale.

Nous avons pu observer des toxoplasmes sur des applications de rate ou de ganglions ; ceci a été confirmé par plusieurs auteurs - SIIM - 1959 - DALLENBACH et PIEKARSKI - 1960 - ITO, SUZUKI, SUTO et FUJITA - 1964 - HULDT - 1966- qui considèrent que les empreintes sur lames sont supérieures aux coupes histologiques pour la recherche des toxoplasmes dans les tissus. D'ailleurs les coupes de rate ou de ganglions prévertébraux n'ont que très rarement montré des toxoplasmes.

Par contre, les résultats les plus constants ont été obtenus à partir du foie des souris inoculées par voie intra-péritonéale et surtout des poumons de souris infestés par voie nasale : les toxoplasmes étant retrouvés sur les coupes de poumons dans 10 cas sur 15.

Pour les cobayes

L'inoculation a été réalisé par l'injection sous-cutanée, au niveau de la patte postérieure, de 0,5 ml d'une suspension contenant environ 5.000 parasites par ml. Le nombre de parasites est inférieur à celui inoculé par Melle HULDT - 1966 - à des lapins, soit 500.000 toxoplasmes injectés par voie sous-cutanée dans la patte postérieure.

Nous avons suivant ce procédé, inoculé 10 cobayes. Dans tous les cas, nous avons noté, deux jours après l'injection, l'apparition d'une petite tuméfaction dure au niveau du point d'inoculation sept ou huit jours après on a observé la présence de petits ganglions inguinaux. Les animaux ont été sacrifiés le douzième jour après l'inoculation. Les ganglions inguinaux ont été prélevés immédiatement. A partir de chaque ganglion nous avons réalisé :

- une ponction ganglionnaire,
- un broyat inoculé à deux souris blanches,
- des applications sur lames,

Pour tous les cobayes, l'un des ganglions au moins contenait des toxoplasmes. En effet, les souris inoculées à partir de broyat ganglionnaire sont toutes mortes dans un délai de sept à dix jours, en présentant une ascite toxoplasmique.

Par contre, le liquide de ponction ganglionnaire prélevé le sixième jour ne nous a montré des toxoplasmes que chez deux des cobayes inoculés.

Ce n'est que pour ces deux animaux que les applications sur lame ou les coupes à la congélation nous ont permis de retrouver des toxoplasmes de façon indiscutable.

Pour tous les autres animaux, dont les ganglions étaient pourtant parasités puisque l'inoculation à la souris était positive, nous n'avons pas pu voir de toxoplasmes.

RECHERCHE DIRECTE DES TOXOPLASMES

chez des animaux d'expérience

Nombre d'examens positifs

Chez la souris	Ascité	Poumon		Foie		Rate		Ganglions prévertébraux	
		A	C	A	C	A	C	A	C
15 inoculées par voie intranasale depuis 7 j.	0	14	10						
15 inoculées par voie intra-péritonéale sacrifiées le 3 ^e j.	15			10	3	4	2	8	2

Chez le cobaye 12 j après inocul.	Broyat inoculé à souris mort des souris	Ponction ganglionnaire	Application sur lame	Coupe à la congélation
10 cobayes inoculés par voie sous-cutanée	10 entre 7 et 12 j. après inoculation	2	2	1

Ces recherches ont été effectuées par une coloration des étalements au May-Grünwald Giemsa.

A = Application

C = Coupe

II - Le conjugué

L'obtention du conjugué fluorescent suppose :

- la préparation d'un immun-sérum anti-toxoplasme de titre élevé.
- la conjugaison avec l'Isothiocyante de Fluorescéine,
- la purification du produit obtenu.

1 / Obtention des immun-sérums

Dans un cas nous avons préparé du conjugué fluorescent en partant d'un sérum humain positif au 1/8000 e en Test de Lyse. Cette méthode permet d'éviter toutes les difficultés que suppose l'immunisation d'animaux.

Cependant, la conjugaison exige une assez grande quantité de serum qu'il est rarement possible de prélever chez un malade. C'est pourquoi, l'essentiel de nos essais a été réalisé en partant de sérums de cobayes infestés au laboratoire.

La difficulté réside surtout dans le fait, qu'à cause de sa virulence, la souche de toxoplasmes utilisés (souche Rh de Sabin) tue rapidement le cobaye avant que celui-ci n'ait pu élaborer des anticorps à un taux suffisant. En effet, l'injection intra-péritonéale d'un nombre très minime de parasites (de l'ordre de 10 toxoplasmes) provoque la mort de la quasi totalité des animaux dans les neuf à dix jours suivant l'injection.

Pour obtenir une immunisation dans de bonnes conditions nous avons utilisé la technique suivante mise au point depuis plusieurs années au Laboratoire de Parasitologie et Pathologie Exotique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon par le Docteur DESPEIGNES :

On prélève 1 ml de liquide d'ascite chez une souris inoculée par voie intra-péritonéale, depuis deux jours. Ce liquide est dilué au 1/10 dans de l'eau distillée stérile, ce qui a pour effet de lyser les toxoplasmes et de libérer l'antigène soluble ; cette lyse est complétée par une congélation de 12 heures à -20° C. Après décongélation, on rend ce liquide isotonique par addition de chlorure de sodium et l'on inocule les cobayes par voie sous-cutanée à raison de 1 ml de liquide par animal (en moyenne ce volume correspond à 1000 toxoplasmes).

Dans la plupart des cas, l'injection de toxoplasmes lysés ne produit aucune réaction et l'on ne note même pas d'adéno-pathie au voisinage du point d'inoculation. Celle-ci semble entraîner un véritable effet vaccinant puisque les cobayes peuvent supporter, par la suite, l'inoculation de toxoplasmes vivants. Cette deuxième injection est pratiquée par voie intra-péritonéale 15 jours après la première injection, avec environ 1000 toxoplasmes.

Des inoculations, toujours de 1000 toxoplasmes vivants, sont régulièrement répétées tous les mois.

Les contrôles sérologiques effectués par le Test de Lyse de Sabin et Feldman révèlent une montée rapide de taux des anticorps, dès la première semaine, comme nous avons pu le vérifier par la méthode individuelle que nous verrons plus loin.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque dès que le Test de Lyse est positif au 1/8000e. Après séparation, le sérum est conservé à + 4° C sans addition de produit antiseptique, mais la conjugaison doit être effectuée aussi rapidement que possible.

2/ Conjugaison

Nous avons successivement utilisé deux techniques de conjugaison, la méthode "classique" et une technique simplifiée mise au point à l'Institut Pasteur de Lyon.

Méthode classique =====

utilisée à Lyon par Melle le Docteur MURAT, et citée par P. AMBROISE-THOMAS dans sa thèse - 1963 - cette technique comprend trois temps principaux :

- concentration des anticorps par précipitation de la fraction gamma-globulinique,
- dialyse de la solution globulinique reconstituée et détermination de son taux d'azote,
- conjugaison avec le fluorochrome.

a) Concentration des anticorps par précipitation de la fraction globulinique :

elle permet d'éliminer le plus possible des protéines immunologiquement indifférentes dont la présence au sein du conjugué diminuerait la spécificité de la réaction.

La précipitation est obtenue par du sulfate d'ammonium à demie saturation comme l'indiquent DEACON, BOREL et DUREL.

Le mode opératoire est le suivant :

- diluer le sérum au demi avec une solution saline tamponnée :

. Chlorure de sodium	8,5 g
. Phosphate disodique	1,38 g
. Eau distillée QSP	1000 ml

- refroidir le mélange en le mettant dans un becher plongé dans un bain de glace et placé sur un agitateur magnétique.

- ajouter progressivement et en agitant doucement un égal volume de solution saturée de sulfate d'ammonium à 620 g pour 1000 ml d'eau distillée, préalablement refroidie à + 4° C. (En fait, nous avons constaté, lors des différents essais de préparation de conjugué, que le refroidissement préalable était inutile, à condition d'ajouter très lentement le sulfate d'ammonium).

- maintenir l'agitation 15 minutes, puis laisser reposer une à deux heures à + 4° C.

- centrifuger à + 4° C (10.000 t/min pendant 15 minutes ou 6.000 t/min pendant 30 minutes).

- laver le précipité de globulines par une solution de sulfate d'ammonium demi-saturée, refroidie à + 4° C.

Pour ce lavage on utilise une quantité égale à quatre fois le volume initial de sérum.

- centrifuger comme précédemment à + 4° C, 15 minutes à 10.000 t/min. Le culot de centrifugation représente la fraction gamma-globulinique.

b) Dialyse de la solution globulinique reconstituée et détermination de son taux d'azote.

- Dialyse

Le culot de centrifugation est remis en suspension dans une solution saline tamponnée dont on utilise un volume égal au 1/3 du volume initial du sérum. La solution est versée dans un sac de collodion et le tout est plongé dans un récipient contenant un à deux litres de solution saline tamponnée.

La dialyse s'effectue à + 4° C sur agitateur magnétique. Pour éviter que le sac de dialyse ne soit crevé par le barreau aimanté de l'agitateur, il faut le fixer à un petit flotteur : bouchon de liège par exemple.

Le bain de dialyse doit être changé fréquemment.

La dialyse est poursuivie jusqu'à ce que l'ion ammoniacal ait complètement disparu. Ceci est vérifié à l'aide du réactif de Nessler en milieu sulfurique ; en présence d'ion ammonium il se produit un précipité orangé.

Réactif de Nessler :

. Bi-iodure de mercure	45, 5 g
. Iodure de Potassium	34, 9 g
. Eau distillée	500 ml

Après dissolution, ajouter 200 ml d'une solution de potasse (10 M). Compléter à un litre (eau distillée)

- Détermination du taux d'azote

La dialyse terminée il faut doser l'azote contenu dans la solution de globulines.

On utilise pour cela la méthode colorimétrique de GORNALL, à l'aide du réactif du Biuret.

* Dosage colorimétrique au Biuret.

Réactif

. Sulfate de cuivre (SO_4Cu , 5 H_2O)	1, 5 g
. Tartrate double de sodium et de potassium	6 g
. Soude décarbonatée	30 g
. Iodure de potassium	1 g
. Eau distillée QSP	1000 ml

Ce réactif se conserve bien à l'obscurité en flacon paraffiné. La gamme d'étalonnage est préparée en diluant une solution protidique de référence (Lab. Trol. MERIEUX à 70 % de Proteins) au 1/10e, 1/20e, 1/40e, et 1/80e en eau saline tamponnée.

La réaction a lieu comme suit :

- mettre dans un tube à essai :

- | | |
|---|------|
| • une solution protidique à titrer (diluée au 1/10e). | 1 ml |
| • réactif | 4 ml |

Laisser 30 minutes à la température du laboratoire. Faire la lecture à l'électrophotomètre de MEUNIER à 550 millimicrons, par rapport à un témoin où la solution protidique est remplacée par 1 ml de solution saline tamponnée, maintenue elle-même à 20, 25 ° C pendant 30 minutes.

Résultats

En se référant à la courbe d'étalonnage, on détermine le taux de protéines contenu dans le sérum. La concentration protidique généralement trouvée au cours de nos essais variait entre 3 et 3,5 %.

c) La conjugaison

Elle s'effectue avec, comme fluorochrome, l'isothiocyanate de fluoresceïne (B. D. MERIEUX).^{*} Voici quelles en sont les différentes étapes :

- calculer à quel volume final il faut amener la solution de globulines pour obtenir une concentration de 1 % de protéines.

- peser l'isothiocyanate de fluoresceïne à raison de 0,05 mg par mg de protéines contenues dans la solution de globulines titrées.

- dissoudre l'isothiocyanate dans un volume de solution saline tamponnée à pH 9 de formule :

- | |
|---|
| • carbonate de sodium : 10,6 g dans 200 ml d'eau distillée |
| • bicarbonate de sodium : 25,2 g dans 650 ml d'eau distillée. |

^{*} L'isothiocyanate de Fluoresceïne est préféré à d'autres fluorochromes par de nombreux auteurs : MARSHALL J. D., EVELAND W. C., et SMITH C. W. - 1958 -
RIGGS J. L., SEIWARD R. J., BURCKHALTER J. H., DOWN C. M. et MELTACLF T. G. - 1958 - NAIRN - 1961 -

Prendre 400 ml de la solution de bicarbonate que l'on ajoute à 100 ml de la solution de carbonate. Ajuster à pH 9.

Le volume de la solution tamponnée est égal au 1/10e du volume final désiré.

- ajouter à la solution d'isothiocyanate de fluorescéine la solution globulinique. Compléter par une solution saline tamponnée à pH 7 jusqu'à obtention du volume final désiré.

- mettre dans un bécher, un agitateur ; maintenir l'agitation pendant 18 heures à + 4° C. Cette agitation permet l'union globulines-fluorochrome.

- dialyser la solution contre une eau saline tamponnée à pH 7 à + 4° C en changeant fréquemment le bain de dialyse. Ceci permet d'éliminer l'excès de fluorochrome. Il faut poursuivre la dialyse jusqu'à disparition totale de la fluorescence des eaux de dialyse, examinées en lumière ultra-violette.

Le produit ainsi obtenu devra être purifié par adsorption par de la poudre de foie.

3/ Purification

Elle a pour objet de réduire les fluorescences non spécifiques. Elle est réalisée par une ou plusieurs absorptions par de la poudre desséchée de foie.

- Obtention de la poudre de foie

Nous avons utilisé du foie de cobaye. Grossièrement coupé en petits cubes ce foie est placé dans un mixer avec environ 50 ml d'eau distillée.

En quelques minutes, on obtient une suspension homogène presque liquide. On répartit le mélange dans de gros tubes à centrifuger. La centrifugation s'effectue pendant 5 minutes à 4.500 t/min. On décante le surnageant et on ajoute une quantité équivalente d'eau distillée. On centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions. Il faut répéter 5 à 8 fois l'opération pour avoir un surnageant pratiquement limpide.

On procède alors à deux lavages successifs avec cette fois, du sérum physiologique. GOLDMAN filtre la suspension et verse une certaine quantité d'acétone sur le résidu de la filtration. Nous avons préféré procéder de la façon suivante :

Le culot provenant du dernier lavage est remis en suspension

dans de l'eau distillée.

Après centrifugation on décante le surnageant et l'on ajoute une quantité égale d'acétone. On centrifuge à nouveau. En répétant cette opération trois ou quatre fois on obtient une poudre qui "s'émiette" sous les doigts.

Cette poudre est alors facilement prélevée. Elle est placée à l'étuve à 37° C jusqu'à complète dessiccation (une demi-journée environ).

- Absorption

Elle s'effectue pendant une demi-heure à 37° C, en agitant de temps à autre le mélange réalisé avec le conjugué et la poudre de foie, à raison de 100 mg de poudre par ml de conjugué.

Le produit est ensuite centrifugé à une vitesse aussi élevée que possible de manière à limiter la perte de conjugué qu'entraîne toujours l'absorption.

Comme l'a indiqué P. AMBROISE-THOMAS - 1963 - cette absorption modifie les propriétés du conjugué, qui, ainsi purifié, donne des réactions un peu moins intenses, mais nettement plus spécifiques.

4/ Conservation

Il existe en pratique trois procédés de conservation :

- la lyophilisation,
- l'addition de glycérine,
- l'addition de merthiolate à 1 pour 10.000
- la conservation à basse température.

- La Lyophilisation offre évidemment l'avantage de conserver intactes les propriétés des anticorps. Par contre, il semble, qu'après lyophilisation les liaisons entre le fluorochrome et les immunoglobulines soient fragilisées et que l'on ait ainsi un plus grand risque de fluorescence non spécifique.

A L'exception d'un essai nous n'avons pratiquement jamais tenté de conserver le conjugué par cette technique.

- L'addition de glycérine est le procédé de conservation qui tend à se généraliser. Il permet de stocker le conjugué à + 4° C, sans détérioration, pour plusieurs semaines et même pour plusieurs mois.

Conjugaison :

Les globulines se trouvent dans le culot de centrifugation. Celui-ci est remis en solution jusqu'à obtention du volume initial de l'immunsérum. On ajoute alors 1 mg d'isothiocyanate de fluorescéine par ml de volume final de conjugué.

Pour cela le précipité de globulines est dissous dans du tampon pH 7,2 et amené à la moitié ou au deux tiers du volume final. Par ailleurs, la quantité déterminée d'isothiocyanate est dissoute séparément dans 1/10e du volume final de tampon pH 9.

On ajoute encore la quantité nécessaire d'une solution à 1 % de merthiolate pour obtenir une concentration finale de 1 pour 5.000 et on ajuste au volume final avec du tampon pH 7,2. Après 12 heures à + 4° C la fixation est complète.

D'après NIEL et FRIBOURG-BLANC il n'est pas nécessaire de faire suivre la conjugaison d'une dialyse. En effet, la quantité de fluorochrome non fixée serait négligeable.

Cette méthode est donc dans son ensemble beaucoup plus simple que la technique classique, mais nous n'en avons personnellement pas l'expérience.

Comme technique simplifiée nous en avons en effet utilisé une méthode mise au point par l'Institut Pasteur de Lyon, par Mr. BETAÏL.

On couple directement le sérum avec le fluorochrome. On détermine la teneur en protéines par la méthode du Biuret, et on ajoute l'isothiocyanate de fluorescéine à raison de 1 partie pour 100 parties de protéines à conjuguer. La conjugaison s'effectue en 12 heures à + 4° C, puis le conjugué est purifié par chromatographie sur Sephadex, dialyse et absorption sur poudre d'organes. Nous allons exposer ici ces différentes étapes de la purification.

a) Chromatographie sur Sephadex

- Principe :

Le Dextrane traité par l'épichlorhydrine en milieu alcalin donne la formation d'un système réticulé qui présente les propriétés d'un tamis moléculaire. Cette substance (Sephadex : M 24) en milieu aqueux prend l'aspect d'un gel. Selon la taille des mailles formées par les ponts glycéryle, certaines molécules peuvent pénétrer à l'intérieur des billes de Sephadex, alors que d'autres, de volume plus important, restent dans le liquide environnant. On peut ainsi effectuer un véritable tamisage moléculaire.

La poudre de Séphadex mise en contact avec l'eau gonfle dans la mesure où l'eau pénètre à l'intérieur des mailles. Ce gonflement est fonction inverse du nombre de ponts glycéryle. En effet, une réticulation très importante s'oppose à la dilatation des grains de Sephadex. A la limite un dextran peu polymérisé donne une pseudo-solution. On définit donc la réticulation du Sephadex par le poids d'eau utilisé pour obtenir le gonflement maximum de dix grammes de poudre sèche.

Un Sephadex G 25 (25 g d'eau pour 10 g de poudre sèche) est très finement réticulé alors que les mailles du Sephadex G 200 sont beaucoup plus lâches. On dispose commercialement de Sephadex G 25, G 50, G 75, G 100 et G 200.

Lorsqu'un échantillon contenant un mélange de produits de faible poids moléculaire et de poids moléculaire élevé est déposé à la surface supérieure d'une colonne de Sephadex, les petites molécules peuvent pénétrer dans les grains de gel et ainsi sortent de la colonne après les grosses molécules qui, seules, se déplacent dans l'espace interstitiel.

Avec une colonne de Sephadex G 25 de dimension suffisante les électrolytes, ayant un espace de diffusion plus important, sont suffisamment retardés pour être séparés des protéines pour lesquels l'espace de diffusion est plus restreint. On peut ainsi obtenir une solution de celles-ci dans un tampon.

Avec un séphadex de réticulation plus lâche (G 100 et G 200) les protéines de plus faible poids moléculaire peuvent pénétrer à l'intérieur des grains du support. On obtient ainsi un fractionnement partiel en fonction du poids moléculaire.

- Mode opératoire :

Comme l'ont conseillé ZWAAN et VAN DAM - 1961 - nous avons utilisé le séphadex G 50 * qui donne de bons résultats.

Ce procédé chromatographique utilisé par HUDSON B. W - 1961 - PETERS J. H., Mc DEVITT, H. O., PALLARD L. W., HARTER J. G., COONS A.H. - 1961 - nécessite une colonne en verre de 20 cm de long et de 3 cm de diamètre.

La préparation du gel se fait en laissant gonfler le séphadex

* Sephadex G 50 : Pharmacia Ltd UPPSALA Sweden représenté en France par JARRE JACQUIN - 18 rue P. Curie - PARIS 5 -

dans du tampon phosphate (une partie de Sephadex pour 10 parties de tampon phosphate) pendant 24 heures. Le Sephadex ainsi préparé peut être conservé au frigidaire à $+ 4^{\circ} \text{C}$ pendant plusieurs semaines.

Après avoir monté la colonne sur un support on dispose au fond un disque de papier filtre. La colonne alors est remplie à moitié de tampon phosphate. On ajoute le Sephadex qui sédimente peu à peu. Il faut pendant cette opération maintenir un écoulement goutte à goutte. La sédimentation demande environ une heure. La colonne doit être très homogène et suffisamment tassée pour éviter un passage trop rapide de la solution à purifier.

On enlève ensuite le tampon surnageant au moyen d'une pipette Pasteur munie d'un petit tube de caoutchouc en évitant d'"écorcher" la surface du gel.

On fait alors couler le sérum à purifier goutte à goutte, très lentement, le long de la paroi de la colonne.

On recueille la première fraction qui sera dialysée puis testée. Dès que le sérum a diffusé dans le gel il faut recouvrir celui-ci d'une couche mince de solution tampon pour éviter la dessiccation.

La filtration sur Sephadex entraîne une importante dilution du conjugué fluorescent, le volume obtenu après filtration étant au moins deux fois supérieur au volume initial du conjugué.

b) Le conjugué ainsi obtenu sera dialysé comme dans la technique classique.

c) L'absorption sur poudre d'organe est identique à celle qui a été décrite précédemment. Avant l'emploi, la poudre de foie doit être humidifiée avec du tampon phosphate à pH 7,2. On lave en milieu tamponné et on décante le surnageant après centrifugation.

Le culot de centrifugation est repris par le serum conjugué. On laisse une heure en contact en agitant régulièrement à $+ 4^{\circ} \text{C}$. On centrifuge et on recommence l'opération une deuxième fois.

De même que pour le conjugué préparé selon la technique classique, celui-ci est réparti dans des tubes à hémolyse et placé à -20°C sans addition de merthiolate au 1/10.000 comme le conseillent GOLDMAN, GORDON et CARVER - 1962 -

Dans certains cas une purification plus poussée est nécessaire.

Ainsi les molécules chargées négativement peuvent être responsables de réactions non spécifiques. Certains auteurs NAIRN - 1964 - ROBERT E. , DEDMON, ALBERT W. HOLMES and FRIEDRICH DEINHARDT - 1964 - utilisent successivement le Sephadex et le DEAE Sephadex, ce dernier jouant le rôle d'échangeur d'ions.

Comme le Sephadex ce gel élimine le fluorochrome non fixé aux protéines, les sels présents dans le tampon mais il retient en outre diverses protéines étrangères chargées négativement. Nous n'avons pas utilisé ce dernier procédé, ayant obtenu par l'une des deux méthodes décrites, des résultats satisfaisants.

Pour les conjugués préparés par cette méthode simplifiée nous avons préféré la filtration sur séphadex suivie d'une dialyse et d'une absorption par poudre de foie. Cette triple opération suffit à faire disparaître la majeure partie des fractions non spécifiques.

COMPARAISON DE LA VALEUR DE CES CONJUGUES

Il faut d'abord rappeler que la spécificité immunologique du conjugué dépend surtout du titre de l'immun-sérum utilisé pour la préparation de ce conjugué. L'immun-sérum doit avoir un titre suffisamment élevé pour, qu'après conjugaison il puisse être employé à des dilutions supérieures au 1/10e. Pour chaque lot de conjugué on retient la dilution qui correspond au maximum de spécificité ; fluorescence aussi intense que possible des toxoplasmes et au contraire, très faible fluorescence des éléments non toxoplasmiques. Plus cette dilution peut être élevée, plus on a des chances de disposer d'un conjugué spécifique, la dilution étant en pratique l'un des plus surs moyens d'éliminer les fluorescences parasites.

- Pour comparer les deux méthodes de conjugaison nous avons disposé de sept lots d'immun-serums antitoxoplasmiques ; chacun de ces lots a été divisé en deux parties égales qui ont été respectivement conjuguées par l'une et l'autre méthode décrite.

La technique classique, malheureusement très longue (de l'ordre de 10 à 15 jours) nous a donné d'excellents résultats et ceci d'une manière constante. En effet, les conjugués obtenus par cette méthode ont pu être utilisés à une dilution au moins égale au 1/10e la plupart du temps au 1/50e. Par contre, la méthode

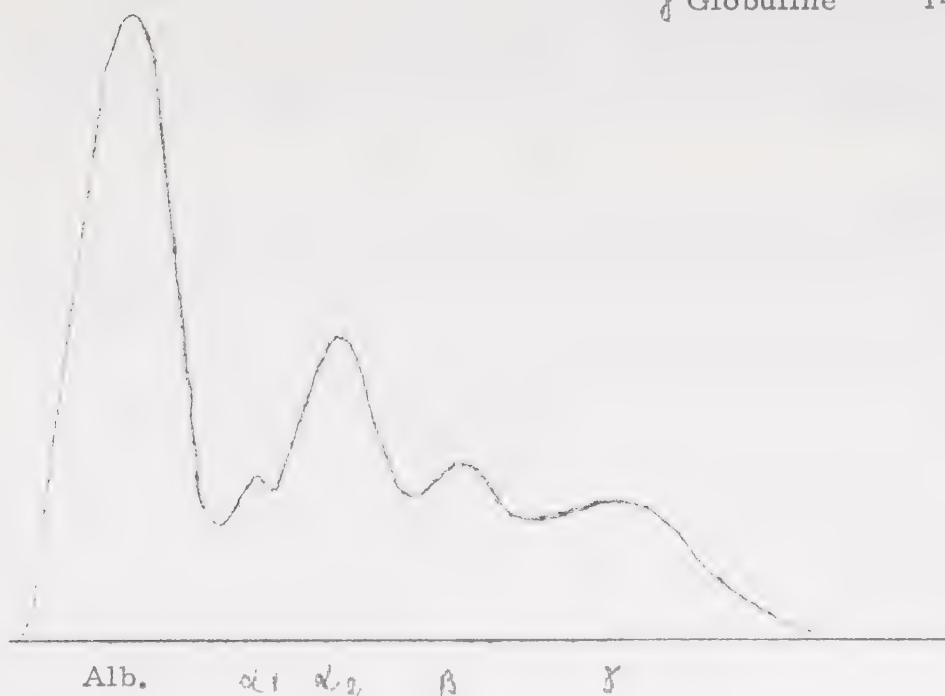
simplifiée ne nous a jamais fourni que des conjugués assez décevants qui devaient être employés purs, ce qui multiplie les risques de réactions non spécifiques. Par ailleurs, même non dilués, ces conjugués ne provoquaient qu'une fluorescence assez faible au niveau des toxoplasmes observés.

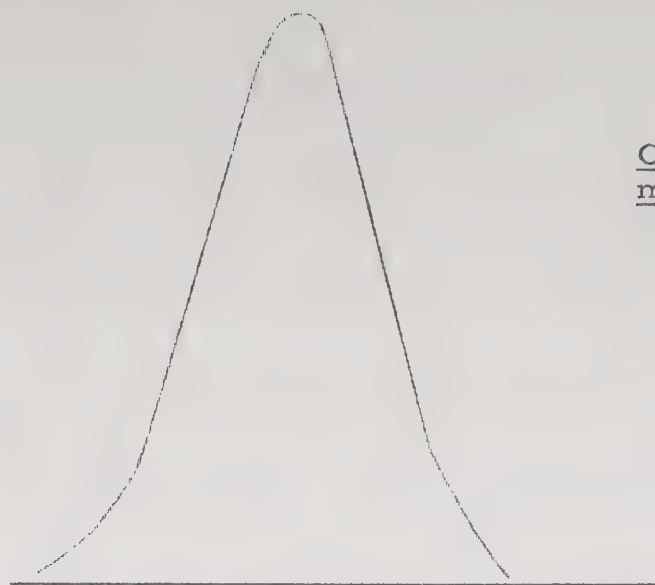
Pour essayer d'expliquer l'inégale valeur de ces deux séries de résultats nous avons effectué une électrophorèse sur deux conjugués E et F préparés chacun suivant une des méthodes considérées, en partant d'un même immun-sérum (immun-sérum N° 3).

Ces électrophorèses ont été faites au moyen d'une cuve et d'un redresseur "elphor". Nous avons employé une solution tampon pH 8,6, force ionique 0,10 (Barbital sodique acide chlorhydrique). La migration sur papier Schleicher et Schull a duré 12 heures sous une tension de 110 V. Les protéines ont été colorées au vert sulfo. Nous avons photométré les bandes au moyen d'un réfractomètre Chromoscan Loeb-Joyce.

Conjugué F préparé par la méthode simplifiée :

Albumine	46 %
α_1 Globuline	6 %
α_2 Globuline	20 %
β Globuline	14 %
γ Globuline	14 %





Gamma G

Conjugué E préparé par la
méthode classique

Gamma-
Globuline : 100 %

Le conjugué E obtenu par la méthode classique ne comporte que des gamma globulines, par contre, l'électrophorégramme du conjugué F (obtenu par la méthode de l'Institut Pasteur de Lyon) met en évidence plusieurs pics et notamment une fraction importante se situant au niveau des albumines, et en ce qui concerne les globulines, si les alpha et gamma globulines sont décelables le pic de gamma globulines est de très faible amplitude.

Il semble donc bien que cette méthode simplifiée ne permette pas l'obtention d'un conjugué suffisamment riche en gamma globulines. Une importante fraction de ces gamma globulines disparaît après conjugaison et au contraire, d'autres protéines sont présentes dans le produit obtenu.

Compte tenu de ces résultats, la meilleure technique de conjugaison paraît être la méthode classique qui, si elle est longue et délicate permet au moins d'obtenir des résultats satisfaisants.

III - Contre-coloration

Sur les applications sur lame ou dans les coupes à la congélation, de très nombreux éléments présentent une auto-fluorescence jaune verte. Cette fluorescence non spécifique, est d'assez faible intensité, mais elle gêne l'observation et le repérage des toxoplasmes surtout si ces éléments sont présents en petit nombre.

Pour masquer cette autofluorescence il est nécessaire d'utiliser une contre-coloration. Comme contre-colorant nous avons d'abord employé de l'albumine bovine conjuguée à de la rhodamine (R. B. A.) Ce contre-colorant est l'un des plus anciennement connus et grâce à lui SADUN - 1962 - avait obtenu des réactions très nettes pour le diagnostic sérologique de la bilharziose. KELEN, AYLLON, LENDL et LABZOFFSKY - 1962 - STADTSBAEDER, S. TELLIER-VERHEYDEN et M. WEBER - 1964 - l'ont également utilisé pour le diagnostic de la Toxoplasmose, mais pour notre part il ne nous a donné que des résultats décevants, la contre-coloration n'étant pas suffisante pour masquer totalement l'autofluorescence des tissus parasités.

Nous avons finalement utilisé le bleu Evans qui, au contraire nous a donné des résultats extrêmement nets. Ce produit a été employé à l'origine par NICHOLS et Mc. COMB - 1962 - pour le diagnostic par immuno-fluorescence du trachome puis par GOLDMAN pour l'étude sérologique de l'amibiase par les anticorps fluorescents.

A Lyon, ce produit a été employé pour diverses applications, notamment l'Echinococcose alvéolaire, la Distomatose, la Bilharziose. Il offre l'avantage d'une grande facilité d'emploi, n'entraîne qu'un allongement très minime de la durée de la réaction et augmente considérablement la netteté des résultats.

Nous préciserons en même temps que l'ensemble du mode opératoire les conditions dans lesquelles nous avons utilisé le Bleu Evans. Récemment nous avons apporté une modification à la technique décrite en ajoutant directement le Bleu Evans dans le conjugué dilué. Ceci permet de diminuer le temps de la réaction et donne d'aussi bons résultats.

C - MODE OPERATOIRE

Pour chaque type de préparation (étalements ou coupes d'ascite toxoplasmique, applications sur lame ou coupes à la congélation des divers organes parasités), la réaction d'immuno-fluorescence directe a été pratiquée de la façon suivante :

1/ Fixer les préparations en les plongeant pendant dix minutes dans un bain d'acétone à la température ordinaire.

2/ Après évaporation à l'air de l'acétone, recouvrir chaque préparation de quelques gouttes de conjugué fluorescent anti-toxoplasmique pris à sa dilution optimale. Laisser réagir pendant une demi-heure à 37° C en plaçant les lames en atmosphère humide.

3/ Laver à deux reprises dans des bains de solution tampon à pH 7,2 (cinq minutes dans chaque bain).

4/ Plonger les lames pendant dix minutes dans un bain de Bleu EVANS (R. A. L.) au 1/10.000e dans l'eau distillée (Cette solution ne se conserve que quelques semaines à l'obscurité)

5/ Laver à nouveau dans deux bains successifs à pH 7,2 (cinq minutes chaque fois)

6/ Sécher les préparations devant un ventilateur puis les recouvrir d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,2.

7/ Observer en lumière ultra-violette (Microscope Reichert Zetopan, condensateur à fond clair à sec, filtre d'émission BG 12/3mm filtre d'arrêt CG 9/1 mm et OG 1/1,5 mm.)

D - RESULTATS

Comme nous l'avons indiqué les résultats dépendent de la qualité du conjugué employé. Seuls les conjugués préparés par la technique classique nous ont donné des résultats suffisamment nets.

En fonction des différentes préparations utilisées nous avons

observé :

1/ Sur des étalements de liquide d'ascite, les toxoplasmes sont très nettement visibles même à faible grossissement (objectif x 20, oculaire x 8,5). La contre-coloration teinte en rouge les quelques cellules présentes sur la préparation. La partie centrale des parasites est également teintée en rouge. Seule la périphérie des toxoplasmes présente une vive fluorescence jaune-vert. Cet aspect particulièrement net correspond à celui observé dans les réactions positives obtenues par la réaction indirecte d'immuno-fluorescence.

Dans l'ensemble la fluorescence est suffisamment intense pour que les toxoplasmes soient repérés beaucoup plus facilement par cette méthode qu'après une coloration au May-Grunewald Giemsa et examen en lumière ordinaire.

2/ Sur les coupes à la congélation réalisées en partant de liquide d'ascite, les résultats obtenus sont sensiblement comparables, avec, peut-être une fluorescence un peu moins intense. Dans l'ensemble le repérage des parasites ne pose pas de difficultés même si les toxoplasmes sont coupés suivant différents angles, ils sont facilement identifiés par leur périphérie, jaune verte, brillante, et leur partie centrale rouge.

3/ Pour toutes les autres préparations (étalement de liquide de ponction ganglionnaire, application sur lame ou coupe de différents organes parasités), les résultats ont été beaucoup moins nets qu'avec le liquide d'ascite.

En effet :

- La fluorescence des parasites était un peu moins intense peut-être à cause de la contre-coloration qui ici, est plus importante étant donné l'épaisseur des préparations

- l'identification des toxoplasmes surtout, lorsqu'ils se présentent sous forme d'une section plus ou moins circulaire n'est pas plus facile par immuno-fluorescence que par une technique banale de coloration. Le repérage des parasites est peut-être un peu plus rapide mais dans la plupart des cas leur identification précise reste presque aussi aléatoire que par les méthodes histologiques courantes.

CONCLUSION

Quelle est en pratique la valeur diagnostique des anticorps fluorescents pour le diagnostic direct de la Toxoplasmose sur des coupes d'organes parasités ?

Il ne semble pas que l'emploi de l'immuno-fluorescence (technique directe) modifie la nature des résultats. En effet, la technique d'immuno-fluorescence n'a permis le repérage des toxoplasmes que pour des séries de préparations où la coloration panoptique et l'examen en lumière ordinaire avaient également permis ce diagnostic.

Cependant, l'immuno-fluorescence permet un repérage plus rapide des parasites, et surtout elle facilite l'identification de sections de toxoplasmes assez difficilement identifiables autrement. En effet, sur des coupes colorées suivant les techniques habituelles, on peut assez souvent hésiter devant des images grossièrement circulaires, dont on ne peut affirmer qu'il s'agisse de sections de toxoplasmes. La présence, à ce niveau, d'une fluorescence spécifique obtenue avec un conjugué fluorescent anti-toxoplasmique peut donc fournir un argument extrêmement important qui justifie, croyons nous, l'emploi de l'immuno-fluorescence pour le diagnostic direct de la Toxoplasmose, même si cette technique suppose l'emploi d'un matériel spécial.

En attendant que des améliorations matérielles (installation microscopique et surtout fluorochrome) permettent à l'immuno-fluorescence de faire à elle seule ce diagnostic, cette méthode reste un complément des colorations habituelles.

Dans cette perspective nous avons coloré au May Grunewald Giemsa des coupes précédemment traitées en immuno-fluorescence directe ou inversement; nous avons effectué une réaction directe d'immunofluorescence sur des lames colorées au Giemsa. Dans les deux cas les images obtenues en fluorescence ou en lumière ordinaire sont suffisamment nettes.

Dans ces conditions, il est donc possible de coupler les deux méthodes en réalisant sur chaque lame :

- une coloration au May-Grunewald Giemsa qui fait

éventuellement le diagnostic, ou permet de repérer certaines images douteuses.

- Une réaction d'immuno-fluorescence qui, dans certains cas, permettra d'affirmer la nature parasitaire de ces éléments.

CHAPITRE II

INTERET PRATIQUE DE LA REACTION
D'IMMUNO-FLUORESCENCE (Technique
directe) POUR LE DIAGNOSTIC SEROLO
GIQUE DE LA TOXOPLASMOSE -

Dans sa thèse en 1963, P. AMBROISE-THOMAS avait proposé une réaction indirecte d'Immuno-fluorescence réalisée sur lame et qui, dans l'étude de près de 200 sérums avait donné des résultats pratiquement identiques à ceux obtenus par le Test de Lyse. Profitant de l'expérience acquise depuis lors, dans ce domaine, au Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Exotique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, nous avons essayé d'améliorer encore cette technique, de façon à la rendre aussi rapide que possible et surtout, d'éliminer les cas où l'interprétation des résultats pouvait être difficile..

Par la suite, nous avons vérifié la valeur de cette méthode en la comparant au Test de Lyse par l'étude de 1016 sérums.

C'est à l'aide de cette réaction que nous avons pu, sous la direction de notre Maître, le Professeur J. P. GARIN, mettre en route une enquête sérologique, réalisée dans le cadre de la Maternité de l'Hopital de la Croix-Rousse. Cette enquête, qui vise à la détection précoce de la Toxoplasmose chez la femme enceinte, groupe actuellement 1390 sérums et permet d'apprécier l'intérêt de l'Immuno-fluorescence.

A - ETUDE EXPERIMENTALE : ESSAIS D'AMELIORATION DE LA TECHNIQUE

I - L'antigène

Il est constitué par les toxoplasmes eux-mêmes. Nous avons essayé d'utiliser des parasites de différentes provenances.

a) Origine

. Ascite de souris toxoplasmiques

Comme dans la technique originale d'AMBROISE-THOMAS nous avons essentiellement utilisé des toxoplasmes provenant d'ascite de souris inoculées par voie intra-péritonéale avec la souche Rh de Sabin (300 à 500 .000 Toxoplasmes par souris). L'ascite est prélevée 48 heures à 72 heures après l'inoculation et dans la mesure où ce délai est respecté, nous n'avons constaté aucune variation dans la réactivité antigénique des toxoplasmes. Passé 72 heures il semble au contraire que les parasites aient un pouvoir antigénique légèrement diminué.

Cet antigène nous a donné entière satisfaction. Il est, dans nos conditions de travail, le plus facile à obtenir puisque la réalisation régulière du Test de Lyse au laboratoire suppose déjà l'entretien des toxoplasmes sur des souris.

D'ailleurs c'est ce type de matériel que la plupart des auteurs ont utilisé jusqu'ici, et notamment GOLDMAN et Collaborateurs -
- 1962 - KELEN A. E. et Coll. - 1962 - STADTSBAEDER - 1964 - CAMARGO - 1964 - CAPPONI - 1966 -

- Purification =====

La présence de très nombreuses cellules endothéliales ou de leucocytes dans le liquide d'ascite rend indispensable sa purification. Celle-ci est facilement réalisée par des centrifugations différentielles. On procède de la manière suivante :

- Après avoir sacrifié les souris inoculées depuis deux ou trois jours au maximum, on prélève la totalité du liquide d'ascite puis on réalise un lavage péritonéal avec quelques millilitres (2 ou 3)

de serum physiologique stérile. Au total le liquide d'ascite doit être dilué dans 4 fois son volume de sérum physiologique. On le centrifuge ensuite à faible vitesse (1.500 t/minute) pendant deux minutes. On recueille le surnageant qui est débarassé des gros éléments cellulaires puis on le centrifuge à grande vitesse (4.000 t/ minute) pendant cinq minutes.

Les toxoplasmes présents dans la suspension sont ainsi recueillis dans le culot de la dernière centrifugation.

Les parasites sont remis en suspension dans 4 à 5 ml de sérum physiologique puis centrifugés à nouveau à grande vitesse. On répète une nouvelle fois ce lavage qui est destiné à éliminer toute trace de liquide d'ascite, ou éventuellement d'antigène toxoplasmique soluble.

Le dernier culot de centrifugation est repris par une quantité de sérum physiologique juste suffisante pour amener la concentration parasitaire à environ 200 toxoplasmes par champ, avec un objectif x 40 et des oculaires x 8,5.

A la suite de GOLDMAN la plupart des auteurs formolent la suspension de toxoplasmes. C'est maintenant cette technique que nous utilisons. Le liquide d'ascite prélevé est additionné d'un volume égal de solution tamponnée à pH 7,2 formolée à 2 %. Après contact à la température ordinaire pendant une demi-heure la suspension de toxoplasmes formolés est purifiée comme précédemment. Nous avons obtenu d'excellents résultats par cette méthode. Des sérums de référence testés avec les deux types d'antigènes obtenus à partir d'ascite de souris ont donné les mêmes titres.

. Ascite de Cotton-rat (*Sigmodon hispidus hispidus*)

Pour sa réaction d'agglutination des toxoplasmes FULTON - 1962 - utilise des parasites provenant d'ascite de cotton-rat inoculés par voie intra-péritonéale ; l'utilisation de ces animaux permettrait d'obtenir une ascite très riche en parasites et ne contenant que de rares éléments cellulaires ce qui facilite l'obtention d'une suspension purifiée de toxoplasmes.

Compte tenu de la difficulté avec laquelle on peut obtenir, en France, des cotton-rats notre expérience des résultats obtenus avec

ces animaux est extrêmement limitée.

Nous avons inoculé par voie intra-péritonéale, en utilisant les mêmes doses que pour les souris, 10 cotton-rats en provenance d'Angleterre.

Ces animaux ont été sacrifiés le troisième jour et les ascites toxoplasmiques recueillies.

Dans nos conditions expérimentales nous n'avons obtenu qu'un matériel sensiblement comparable à celui fourni par les souris toxoplasmiques, la richesse en parasites et la présence d'éléments cellulaires étant pratiquement identiques.

Ces résultats décevants nous ont amené à abandonner rapidement ce type d'animal de laboratoire.

. Cultures cellulaires

L'obtention facile de toxoplasmes sur des cultures cellulaires a conduit différents auteurs et notamment LYCKE et LUND - 1964 -, BETZ - 1966 - au Luxembourg, PIERREUX - 1963 à utiliser ce matériel.

La technique utilisée est celle décrite par PIERREUX.

Nous avons employé des toxoplasmes (souche Rh de Sabin) entretenus sur cultures de cellules KB.

L'inoculation des toxoplasmes est effectuée 24 heures après la mise en culture des cellules.

Le milieu nutritif utilisé est le milieu de HANSK enrichi de 0,5 % d'hydrolysate de lactalbumine et de 10 % de sérum de veau et contenant également un complexe antibiotique de pénicilline (200 U/ml) et de streptomycine (200 gamma/ml)

Pour réaliser l'inoculation du matériel infectant, nous avons procédé de la manière suivante :

- Un à deux ml d'exsudat péritonéal de souris inoculée par voie intra-péritonéale, trois jours plus tôt, sont mélangés à

15 ml de milieu nutritif. Ce mélange est ensuite distribué dans des boîtes de Roux renfermant la culture cellulaire âgée de 24 heures. La quantité de l'inoculum infestant est de 5 ml. Les boîtes de Roux sont mises à l'étuve à 37 ° C.

La colonisation des cellules par le parasite est rapide. Vingt quatre heures à trente six heures après l'inoculation on constate une prolifération intense du toxoplasme avec apparition d'un début de Lyse et libération de formes extra-cellulaires.

Nos premiers essais ont porté sur des toxoplasmes prélevés 12 jours après la mise en culture.

Les parasites présentaient d'importantes modifications morphologiques : taille nettement diminuée, abondance de formes globuleuses. Par ailleurs de nombreux parasites présents dans les cultures cellulaires étaient tués au douzième jour.

Les toxoplasmes étaient recueillis par simple centrifugation à basse vitesse (qui élimine les éléments cellulaires) puis lavés à deux reprises dans du sérum physiologique. On a réalisé ainsi des étalements sur lame de toxoplasmes à l'aide desquels plusieurs réactions d'Immuno-fluorescence ont été effectuées.

Par comparaison les mêmes sérums positifs ont été testés avec de l'antigène préparé à partir d'ascite de souris. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

Antigène	Titre des sérums				
	1	2	3	4	5
Ascite de souris	+ 1/3200	+ 1/1600	+ 1/400	+ 1/200	+ 1/3200
Toxoplasmes sur cultures de cellules	+ 1/400	+ 1/20	Neg	Neg	+ 1/400

Antigène	Titre des sérums				
	6	7	8	9	10
Ascite de souris	+ 1/800	+ 1/200	+ 1/400	+ 1/3200	+ 1/800
Toxoplasmes sur cultures de cellules	+ 1/20	Neg.	Neg.	+ 1/200	+ 1/20

L'importante différence existant entre ces deux séries de résultats montre qu'après douze jours de culture les toxoplasmes entretenus sur cellules KB ont un pouvoir antigénique nettement inférieur à celui des parasites provenant d'ascite de souris.

D'ailleurs leur pouvoir pathogène paraît légèrement atténué puisque, des souris inoculées par voie intra-péritonéale ne sont mortes que 6 à 7 jours après l'inoculation au lieu de 3 à 4 jours.

En réalisant à partir de ces souris un passage à d'autres souris par inoculation intra-péritonéale nous avons pu voir la souche de toxoplasmes reprendre sa virulence. Les résultats sont en contradiction apparente avec les conclusions de PIERREUX qui considère que l'entretien des toxoplasmes sur des cultures de cellules ne modifie pas la virulence de la souche. En fait, PIERREUX s'intéresse surtout au nombre de repiquage, les parasites étaient prélevés le cinquième jour, alors qu'au début, notre expérience a porté sur des parasites entretenus sur culture depuis 12 jours en moyenne.

Cette première série de résultats décevants s'explique par le fait que nous avons prélevé trop tardivement les parasites. Au cours de nos essais ultérieurs, nous avons suivi l'effet cytopathogène des toxoplasmes sur les cultures cellulaires et nous avons prélevé les parasites dès le moment où ils sont extra-cellulaires, en quantité abondante, c'est à dire le cinquième jour.

Ces étalements réalisés à partir de ces toxoplasmes nous ont fourni exactement les mêmes résultats que ceux obtenus à partir d'ascite de souris. Ceci a été vérifié pour 50 sérums étudiés en Immuno-fluorescence.

Dans la mesure où l'on prélève les parasites dès qu'ils deviennent extra-cellulaires et en quantité suffisante, l'emploi des toxoplasmes provenant de cultures cellulaires en lignée continue paraît donc donner l'excellents résultats.

Compte tenu de nos conditions de travail au Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Exotique, nous n'avons cependant pas utilisé en routine des toxoplasmes de cultures cellulaires.

b) Préparation de l'Antigène

Au cours de notre étude nous avons utilisé les suspensions de toxoplasmes pour fabriquer deux types de préparations antigéniques :

- des étalements secs sur lame,
- des coupes à la congélation.

. Les étalements secs sur lame sont réalisés avec une suspension contenant 200 toxoplasmes par champ.

On utilise des lames microscopiques en verre ordinaire de 8/10 de millimètres d'épaisseur, sur une face desquelles on grave deux cercles de un centimètre de diamètre, et un numéro d'ordre. On dépose une goutte de suspension toxoplasmique au centre de chaque cercle, puis on sèche les lames dans une étuve à 37 ° C.

L'emploi de plus de deux étalements par lame ne nous paraît pas pratique étant donné les possibilités de mélange des gouttes au cours de la manipulation (nous n'avons pas employé de lames siliconées).

Pour l'ensemble de notre étude nous avons dépisté les sérums positifs en utilisant une lame pour chaque sérum étudié au 1/20 et au 1.200. Les sérums ainsi trouvés positifs étaient ensuite repris aux dilutions supérieures.

. Les coupes à la congélation

Nous avons également utilisé des coupes à la congélation préparées à partir de suspension de toxoplasmes dans les mêmes conditions que pour le diagnostic direct. La réalisation de ces coupes est évidemment plus longue que celle des étalements secs mais notre idée était de vérifier si, sur des coupes de toxoplasmes, on ne pourrait pas mettre en évidence les Antigènes toxoplasmiques plus complètement que sur des parasites entiers ou seuls, les antigènes de surface sont explorés.

Cette hypothèse s'est avérée exacte. En effet sur des coupes de toxoplasmes une réaction négative entraîne une fluorescence verte uniforme au niveau de toute la surface de section du parasite. Au contraire, comme nous le verrons plus loin, lorsque

l'on utilise des étalements préparés avec des toxoplasmes entiers, la fluorescence spécifique ne concerne plus que la périphérie des parasites dont le centre est teinté en rouge par la contre-coloration. Il semble donc bien que, à partir des toxoplasmes intacts, seuls les antigènes de surface puissent être révélés, alors qu'en utilisant les coupes de parasites on peut également mettre en évidence les antigènes "somatiques" présents à l'intérieur des toxoplasmes.

Notre expérience est encore très limitée puisque nous n'avons testé que 15 sérums, en parallèle, avec ces deux types d'antigènes (toxoplasmes entiers ou en coupe). Pour ces 15 sérums expérimentés, les deux séries de résultats, strictement identiques semblent indiquer que les antigènes de surface et les antigènes somatiques sont très proches, et peut-être même identiques.

Sur le plan pratique l'emploi des coupes à la congélation est moins commode que les étalements de suspension de toxoplasmes et c'est finalement ce dernier type d'antigène que nous avons utilisé.

Nos essais portant sur 15 sérums n'ont pas montré de différence significative si bien que nous n'avons pas poursuivi notre travail dans cette voie.

c) Conservation

La possibilité de conserver les préparations antigéniques réalisées à l'avance présente une grosse importance pratique dans l'emploi et la standardisation de la réaction d'immuno-fluorescence ; nous avons essayé d'améliorer le plus possible les conditions de conservation.

. Pour une conservation de l'ordre de quelques semaines (4 à 5) les lames peuvent être placées à la glacière à + 4° C, sans fixation préalable. Il n'en résulte aucune altération antigénique, ce que nous avons vérifié à plusieurs reprises.

. Une conservation de plus longue durée (de l'ordre de 5 à 6 mois) est assurée dans de bonnes conditions au congélateur à - 20° C.

. Enfin, il semble qu'une conservation de durée quasi illimitée puisse être réalisée en gardant les toxoplasmes sous forme de suspension lyophilisée.

Nos essais ont été pratiqués soit à partir d'une suspension de parasites dans du sérum physiologique, soit comme le conseillent TAKUMI et coll., à partir d'une suspension formolée de toxoplasmes dans une solution de saccharose à 5 %.

Cette suspension est préparée de la façon suivante :

- le liquide d'ascite prélevé sur des souris inoculées trois jours avant est additionné d'un égal volume de solution tampon à pH 7,2 contenant 2 % de formol.

- Le mélange est laissé 30 minutes à la température de la pièce, puis centrifugé à 2.000 tours pendant deux minutes : les grosses cellules sédimentent.

- Les toxoplasmes sont présents dans le surnageant. Celui-ci est centrifugé à grande vitesse pendant 5 minutes. Après décantation du surnageant les parasites rassemblés dans le culot de centrifugation sont lavés à deux reprises dans une solution de saccharose à 5 % puis centrifugés.

Le dernier culot est repris par cette solution sucrée. La suspension ainsi préparée est répartie en flacon (type flacon de pénicilline) à raison de un ml par flacon, puis lyophilisée.

Les flacons subissent une congélation préalable à -25°C . pendant 15 minutes, suivant la technique dite "à la coquille" puis on les branche à la cuve à vide (vide de 100 microns de Hg.

La température du condensateur est à -45°C . La lyophilisation dure une heure et demie à deux heures. L'appareil utilisé est un modèle VIRTIS 10-146 MR - BA.

Après lyophilisation, ces flacons peuvent être conservés à la glacière à $+4^{\circ}\text{C}$ ou même, à la température ordinaire.

Au moment de l'emploi, on remet les toxoplasmes en suspension dans un ml d'eau distillée. On réalise alors des étalements

sur lame comme précédemment. Nous avons testé 100 sérums sur des étalement obtenus à partir d'ascite lyophilisée et d'ascite non lyophilisée comparativement. Les résultats trouvés sont identiques pour les deux antigènes.

II - Les sérums étudiés

Conservation

Chaque fois que cela a été nécessaire les sérums étudiés ou les sérums témoins ont été conservés sans addition d'antiseptique, au congélateur à -20° C.

Il semble cependant que passé plusieurs mois on assiste à une légère diminution du taux des sérums conservés, si bien que la conservation de sérum étalon nous semblerait exiger une lyophilisation du sérum ou une conservation dans un congélateur à azote liquide.

Dilutions étudiées

Pour l'ensemble de notre expérience nous avons retenu comme dilution initiale le 1/20, en eau tamponnée à pH 7,2, qui assure une bonne spécificité à la réaction. Les sérums sont également testés au 1/200, et s'ils se révèlent positifs à cette dilution, ils sont repris ultérieurement à des dilutions supérieures.

En pratique, chaque lame microscopique que nous utilisons présente deux étalements antigéniques, ce qui permet de tester un sérum au 1/20 et au 1/200 à l'aide d'une seule lame. Ceci entraîne une sécurité supplémentaire et n'allonge la réaction que de façon minime.

III - Le conjugué

Pour des raisons de commodité pratique nous n'avons pas nous même fabriqué notre conjugué anti-globuline humaine. Nous avons utilisé un produit de commerce : sérum fluorescent anti-globuline humaine (Institut Pasteur).

Conservation

Comme l'indique le fabricant, ce produit peut être conservé à la galcière à + 4° C, et en fonction de notre expérience actuelle, il ne semble pas qu'une conservation au congélateur à - 20 ° C donne de meilleurs résultats, d'autant plus qu'il est alors nécessaire de répartir le conjugué en ampoules ou en tubes par très petites quantités, de manière à éviter une série de décongelations à un même échantillon.

Conditions d'utilisation

- "Témoin conjugué seul"

Etant donné la fréquence des formes inapparentes de la Toxoplasmose il existe toujours un risque pour que les animaux utilisés comme source d'antiglobuline humaine présentent des anticorps anti-toxoplasmiques. Dans ces conditions le conjugué fabriqué à partir de sérum de ces animaux deviendrait inutilisable puisqu'il provoquerait une fluorescence spécifique des toxoplasmes quelque soit la nature du sérum étudié dans le premier temps de la réaction d'immuno-fluorescence. Pour nous mettre à l'abri de tels risques d'erreur nous avons systématiquement testé chaque nouveau flacon de conjugué en réalisant "des témoins conjugué seul". On utilise pour cela des étalements de Toxoplasmes séchés et fixés par l'acétone sur lesquels on fait directement agir le conjugué pris à sa dilution optimale. Après une demi-heure à l'étuve les préparations sont lavées, contre-colorées par le Bleu d'Evans puis après de nouveaux lavages, examinés au microscope en lumière ultra-violette. La coloration rouge des parasites et l'absence de fluorescence jaune verte spécifique permettent de vérifier que le conjugué ne contient pas d'anticorps anti-toxoplasmique et qu'il est, par conséquent utilisable pour la réaction.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé environ 50 flacons de conjugué anti-globuline humaine et en aucun cas nous n'avons décelé la présence d'anticorps anti-toxoplasmiques.

- Dilutions étudiées

Comme nous l'avons déjà indiqué, la meilleure garantie de spécificité réside, pour le conjugué, dans la possibilité de l'utiliser à une dilution aussi élevée que possible. Celle-ci est variable pour chaque application de l'Immuno-fluorescence. Elle est

déterminée par tatonnements, en faisant réagir des sérums connus positifs et négatifs qui sont "relevés" à l'aide de dilutions croissantes du conjugué. On retient la plus forte dilution permettant d'obtenir une vive fluorescence avec le sérum positif et une fluorescence pratiquement nulle avec le témoin négatif.

Pour tous les lots de conjugué que nous avons utilisés nous avons retenu comme dilution optimale le 1/20. Cette dilution est réalisée dans du tampon à pH 7,2.

Cette dilution jointe à la contre-coloration par le bleu Evans nous a fourni d'excellents résultats du point de vue de la spécificité sans qu'il soit nécessaire de purifier à nouveau le conjugué commercial par adsorption sur poudre d'organe (FLETCHER - 1965 -) ou par chromatographie.

IV - Contre-Coloration

Comme la quasi totalité des parasites, les toxoplasmes présentent un certain degré d'auto-fluorescence jaune verte, c'est à dire de la même couleur que la fluorescence spécifique due à l'action d'un serum positif. Il existe une différence d'intensité importante entre les fluorescences spécifiques et non spécifiques. La distinction entre les réactions nettement positives et négatives est facile ; mais comme l'indiquait P. AMBROISE-THOMAS en 1963 il demeure toute une série de réactions "frontières" pour lesquelles on observe une faible fluorescence jaune verte correspondant aussi bien à des images spécifiques qu'à une fluorescence propre aux parasites.

Il est très difficile de trancher, en pratique, et le seul critère de différenciation est, qu'une fluorescence spécifique est généralement plus nette à la périphérie des corps parasitaires tandis que l'auto-fluorescence est le plus souvent uniforme. Quoiqu'il en soit la réaction d'Immuno-fluorescence réalisée suivant les modalités habituelles ne permet pas de lever le doute dans un certain nombre de cas.

C'est pourquoi, nous avons recouru à une contre-coloration et le but est de masquer l'auto-fluorescence des parasites en lui substituant une fluorescence d'une autre couleur généralement rouge.

La lecture des résultats ne correspond plus alors, à une appréciation quantitative de la fluorescence (fluorescence jaune verte plus ou moins intense), mais à une notion qualitative : fluorescence jaune verte spécifique, fluorescence rougeâtre non spécifique.

Nous avons utilisé le Bleu Evans comme contre-colorant à la suite de divers essais précédemment cités.

La contre-coloration est réalisée en plongeant les lames pendant 10 minutes dans un bain de Bleu Evans (R. A. L.) à un pour dix mille dans de l'eau distillée. En pratique nous employons une solution mère à un pour mille qui se conserve plusieurs semaines (6) dans des flacons teintés. Au moment de la réaction cette solution mère est diluée dans dix fois son volume d'eau distillée.

Classiquement la contre-coloration intervient dans le dernier temps de la réaction, après l'action du conjugué fluorescent.

Tout récemment, nous avons tenté d'utiliser simultanément le conjugué fluorescent et le Bleu Evans, en mélangeant un ml de conjugué dilué au 1/20 dans du tampon à pH 7,2 et deux gouttes de Bleu Evans dilué au un pour mille.

Cette technique correspond à celle que CAMARGO et Coll. - 1966 - ont exposée dans un travail dont nous n'avons eu connaissance qu'après nos propres essais.

C'est maintenant cette méthode que nous utilisons. En effet, des vérifications répétées nous ont jusqu'ici montré que des résultats tout aussi démonstratifs pouvaient être obtenus, en mélangeant le Bleu Evans et le conjugué. Notre expérience porte actuellement sur plus de 200 sérums testés parallèlement suivant la méthode ancienne (action du conjugué, puis après deux lavages, action du contre-colorant) et suivant la nouvelle technique (conjugué + Bleu Evans) : les titres obtenus ont été identiques.

V - Installation microscopique

Nous utilisons un microscope Reichert Zetopan équipé pour la fluorescence et le contraste de phase.

Le microscope est muni d'un condensateur à fond clair, "à sec", ce qui, par rapport au condensateur à fond noir, "à huile", utilisé auparavant (P. AMBROISE-THOMAS - 1963-) représente un gros avantage pratique en ce qui concerne la rapidité de la lecture.

Celle-ci s'effectue dans une pièce normalement éclairée, les oculaires sont simplement pourvus d'ocellères en caoutchouc.

Nous utilisons un filtre d'émission BG 12/ 3 mm et des filtres CG 9/1 mm et OG 1/1,5 mm comme filtres d'arrêt.

Enfin, les préparations sont examinées avec un grossissement aussi faible que possible (objectif x 41 ; oculaire x 8,5) de manière à disposer d'une intensité lumineuse assez forte et à pouvoir observer un nombre élevé de parasites dans chaque champ. La lecture est ainsi, à la fois plus rapide et plus sûre.

VI - Technique proposée

A l'issue de ces différents essais, la technique que nous proposons est la suivante :

1/ Préparation de l'antigène à partir d'ascite de souris inoculées par voie intra-péritonéale trois jours avant avec des toxoplasmes de la souche Rh de Sabin.

La suspension est formolée, purifiée par des centrifugations différentielles, puis lyophilisée. Elle contient 3.000 toxoplasmes par millimètre cube, ce qui correspond environ à 200 toxoplasmes par champ avec un objectif x 40 et un oculaire x 8,5.

Sur des lames microscopiques on grave deux cercles de un centimètre de diamètre environ et on dépose au centre de chacun d'eux une goutte de suspension lyophilisée (Le produit sec a été repris par un ml d'eau distillée ; la quantité de suspension initiale étant de un ml).

On laisse sécher les étalements à l'étuve à 37° C puis on place les lames à la glacière à + 4° C (conservation un mois) ou au congélateur à - 20° C (conservation : plus de six mois).

Au moment de la réaction, on laisse sécher les lames à la température ordinaire.

La fixation par l'acétone n'est plus nécessaire puisque l'on formole l'antigène au départ.

2/ Action des sérums étudiés

Les sérums à étudier sont dilués au 1/20 et au 1/200. Déposer une goutte de chaque dilution sur un étalement antigénique. Chaque lame permet donc d'étudier un serum à ces deux dilutions. Si les sérums sont positifs au 1/200 ils seront dilués ultérieurement au 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000.

Placer les préparations une demi-heure à l'étuve à 37 ° C en atmosphère humide.

3/ Lavage

Dans deux bains différents de tampon à pH 7,2 (5 minutes dans chaque bain) puis sécher les lames devant un ventilateur.

4/ Action du conjugué et du Bleu Evans

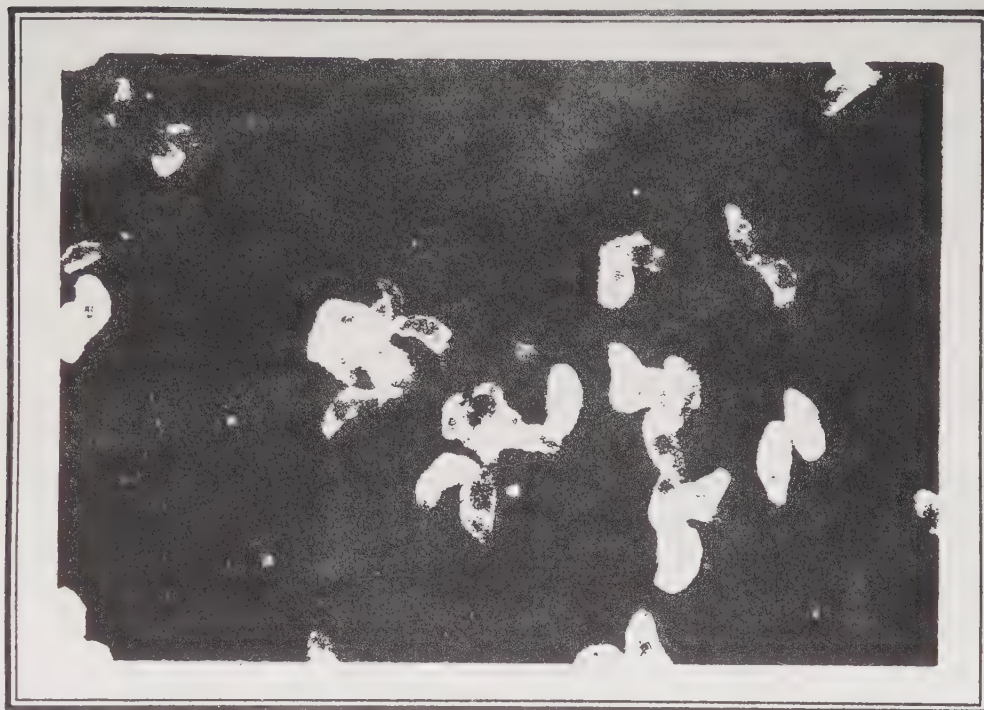
Déposer sur chaque lame une ou deux gouttes du mélange conjugué anti-globuline humaine (Institut Pasteur) dilué au 1/20 dans une solution tampon à pH 7,2, contenant deux gouttes de Bleu Evans au 1/1000 par ml de conjugué.

Comme précédemment laisser réagir une demi-heure à 37°C en atmosphère humide.

5/ Laver à nouveau dans les mêmes conditions qu'au paragraphe 3.

6/ Sécher devant un ventilateur puis recouvrir l'étalement d'une lamelle montée sur de la glycérine à pH 7,2.

7/ Examen au microscope en lumière ultra-violette avec des filtres BG 12/3 mm et CG 9/1 mm OG 1/1,5 mm.



Sérodiagnostic de la Toxoplasmose
par Immuno-Fluorescence sur étalement
de Toxoplasmes:

réaction positive

(la partie centrale des parasites est
colorée en rouge par le Bleu d'Evans)

Etant donné la possibilité de conserver les étalements antigéniques déjà préparés, cette méthode permet facilement d'étudier 50 sérums pris chacun à deux dilutions, la manipulation durant au total trois heures environ.

Dans chaque série de sérums étudiés on inclut deux sérums témoins :

Témoin positif
Témoin négatif

Tous les deux sont dilués au 1/20.

VII - Lecture des Résultats

La lecture des résultats est extrêmement rapide et nette avec le système de filtres utilisés ; les toxoplasmes sont rouge sombre, parfois même difficiles à apercevoir si la réaction est négative ; dans le cas contraire, la partie centrale des parasites est colorée en rouge, mais la périphérie présente une fluorescence jaune verte d'intensité variable.

De nombreux auteurs expriment leurs résultats en fonction de cette intensité par un nombre plus ou moins variable de +. Nous pensons que ce critère risque d'être faussé par des éléments subjectifs ou par une accommodation plus ou moins bonne et c'est pourquoi nous préférons exprimer nos résultats par le chiffre de la dernière dilution à laquelle le sérum donne encore une fluorescence spécifique.

B - RESULTATS

Au total nous avons analysé près de 2.500 sérums prélevés dans leur quasi totalité au cours d'enquête systématique ou chez des malades chez lesquels on soupçonnait une toxoplasmose.

Notre but étant d'utiliser la réaction d'Immuno-fluorescence

pour des enquêtes épidémiologiques, nous nous sommes efforcés, dans un premier temps de bien vérifier la valeur de cette technique, en partant d'un nombre significatif de résultats.

Comme le diagnostic direct de la Toxoplasmose n'est que très rarement réalisable, nos vérifications n'ont pu être effectuées que de façon indirecte par comparaison avec le Test de Lyse des toxoplasmes (Réaction de SABIN et FELDMAN modifiée en France par DESMONTS) qui constitue, jusqu'à présent la réaction de référence en matière de Toxoplasmose.

Cette comparaison Immuno-Fluorescence, Test de Lyse des toxoplasmes a été réalisée :

- chez des cobayes inoculés avec la souche Rh de Sabin,
- à partir de 1016 sérums humains.

I - Etude de la valeur de la Réaction d'Immuno-fluorescence

1/ Comparaison Immuno-fluorescence (I.F) - Test de Lyse (T. L. T.) au cours de la Toxoplasmose expérimentale du cobaye -

Pour apprécier la valeur diagnostique de l'Immuno-fluorescence il était très important de pouvoir préciser sa précocité et c'est dans ce but que nous avons suivi l'évolution sérologique de la Toxoplasmose expérimentale de l'animal.

Notre étude a été réalisée chez le cobaye. La souche Rh de Sabin entraînait normalement la mort des animaux en douze jours environ. Aussi, pour pouvoir étudier l'évolution sérologique de ces animaux pendant plus longtemps, nous avons eu recours à un artifice. Nous avons d'abord injecté aux cobayes, par voie sous-cutanée, une suspension de toxoplasmes lysés. (procédé mis au point par le Docteur DESPEIGNES au Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Exotique - Lyon -).

Quinze jours après, l'inoculation de toxoplasmes vivants (souche Rh de Sabin) n'entraîne plus la mort des animaux, et nous avons pu suivre la montée du taux d'anticorps et sa persistance

pendant plusieurs mois.

Du point de vue immunologique, ceci se rapproche des travaux de Melle HULDT sur le lapin et pose le problème de la recherche d'une vaccination possible par inoculation préalable de Toxoplasmes "modifiés" ou tués ou encore d'une souche moins virulente.

Ceci serait à reprendre car notre but étant seulement de comparer les résultats obtenus avec le Test de Lyse et la réaction d'Immuno fluorescence, nous n'avons pas approfondi cette question.

Parmi les animaux étudiés nous n'avons retenu que deux cobayes pour lesquels nous avons pu effectuer des sérologies répétées. Les résultats obtenus sont résumés dans le graphique de la page 56.

Ces résultats fournissent des renseignements intéressants.

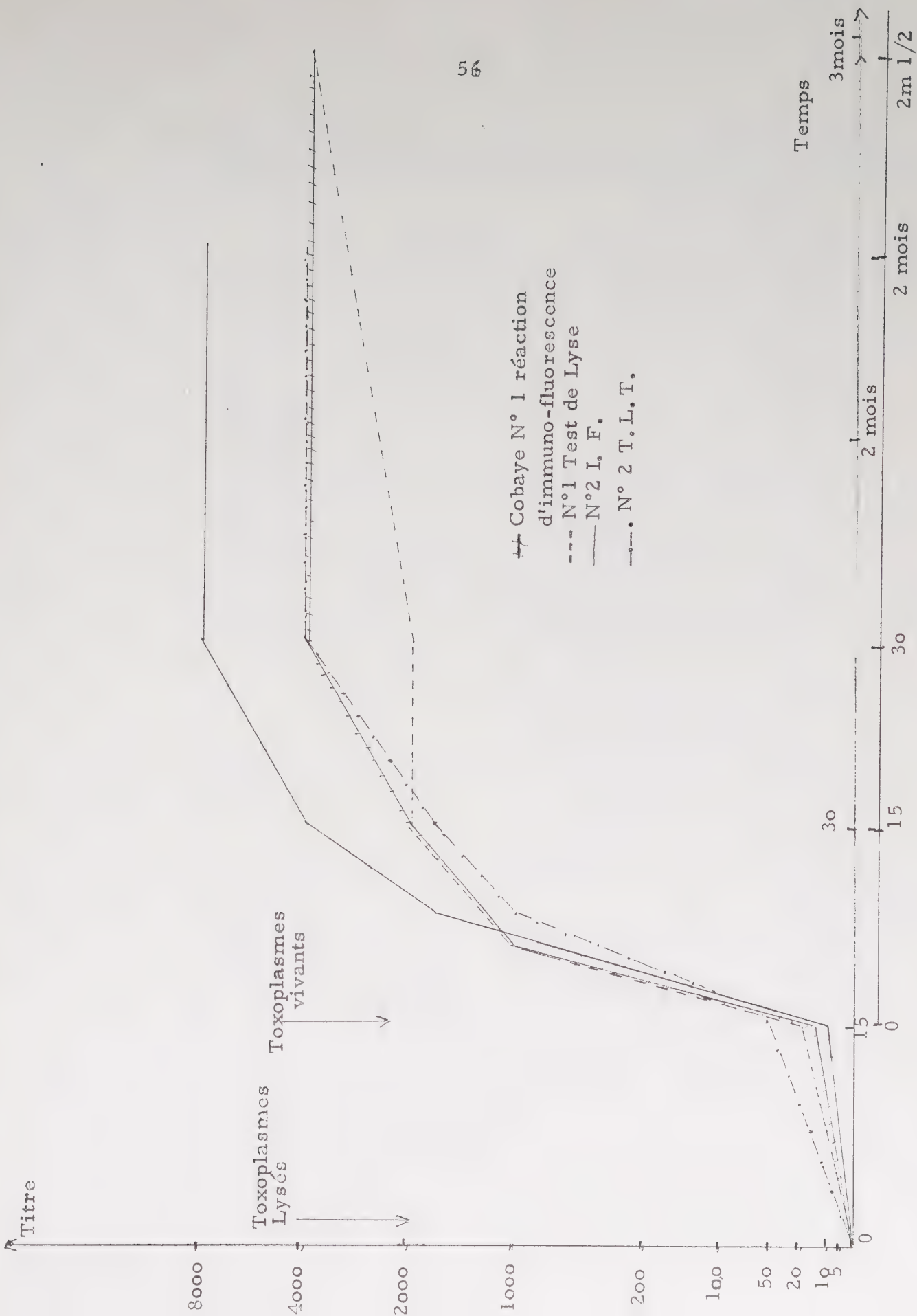
En effet, sur le plan pratique, nous voyons que les deux réactions sont aussi précoces et se maintiennent au même titre pendant trois mois au moins. L'immuno-fluorescence présente une sensibilité légèrement supérieure à celle du Test de Lyse. Ces résultats recoupent ceux de CAPPONI à propos de la Toxoplasme expérimentale du lapin.

Bien que des études chez l'homme n'aient pu être réalisées, on peut donc considérer que les deux méthodes sérologiques se positivent sans doute avec la même précocité au cours des Toxoplasmoses humaines.

D'après ces deux courbes nous pouvons donc dire que les deux réactions utilisées sont comparables.

2/ Comparaison I. F. - T. L. T. à propos de 1016 sérums humains. -

A l'heure actuelle, il y a 3042 sérums qui ont été testés en immuno-fluorescence et en Test de Lyse par différents auteurs français ou étrangers, et dont les résultats ont été publiés et chiffrés. Dans l'ensemble toutes ces études confirment la valeur sensiblement identique de ces réactions.



Dans le tableau suivant, nous n'avons retenu que les études pour lesquelles les auteurs chiffreraient numériquement leurs résultats.

	Nb Sérums	Concordance	Discordance
KELEN et Coll. 1963	617 Canada	5 %	
P. . AMBROISE THOMAS 1963	189 France	92 %	5 %
STADS- BAEDER et Coll. 1964	70 Belgique	100 % pour titre 1/10 à 1/1000 87 % quand titre sup. à 1/1000	0,15 %
CAMARGO 1964	109	43 % concordance stricte 90 % avec une dilu- tion d'écart 90,9 % avec 2 dilu- tions d'écart	
CAMARGO 1966	993	97 % (comprenant une dilution d'écart)	
CAPPONI 1966	64	77 %	23 % discor- dance légère
BRYCE- BENCHOFF 1966	1.000 Amérique	69,7 % avec 1 dilu- tion d'écart 96,4 % avec 2 dilu- tions d'écart	

Si l'on s'en tient à ces résultats, qui, malheureusement risquent de ne pas être complets on voit donc qu'à propos de 3042 sérums, les auteurs travaillant dans plusieurs pays différents observent dans l'ensemble 77 et 96 % de concordance entre le Test de Lyse et l'immuno-fluorescence, à l'exception

de KELEN (5 % de concordance), et que le plus souvent, les différences ne sont que quantitatives et concernent un ou deux tubes de dilution.

Cependant, il faut remarquer que les techniques d'immuno-fluorescence sont parfois légèrement différentes d'un auteur à l'autre, mais surtout, que le Test de Lyse peut présenter d'importantes variations : réaction avec le bleu de méthylène, suivant la technique originale dans les pays anglo-saxons. alors qu'en France, on emploie depuis DESMONTS la lecture au contraste de phase ; et surtout variations inévitables dues au facteur accessoire.

Tout ceci explique donc les différences que présentent entre eux les résultats que nous avons rappelés, mais qui dans l'ensemble indiquent bien une concordance élevée entre les deux tests.

Dans nos conditions expérimentales nous nous sommes efforcés de vérifier cette concordance sur un nombre de sérums aussi significatifs que possible (1016 sérums).

Le Test de Lyse a été réalisé suivant une technique légèrement modifiée : micro-méthode sur lame et non en tube mise au point au Laboratoire de Parasitologie par le Docteur DESPEIGNES. En dehors de certains avantages pratiques, cette micro-méthode donne des résultats pratiquement identiques à ceux du Test de Lyse habituel, la sensibilité étant peut-être légèrement plus élevée.

Tous ces sérums ont été étudiés à la dilution initiale de 1/20 en Immuno-fluorescence et de 1/50 en Test de Lyse.

Nos résultats ont été rassemblés dans le tableau de la page 59.

Etant donné que la dilution initiale a différé pour le Test de Lyse et l'Immuno-fluorescence (1/50 dans l'un et 1/20 dans l'autre) une comparaison de ces deux méthodes n'est possible qu'à partir du 1/200.

I. F. T. L. T	Négatif	Positif 1/20	Positif 1/200	Positif 1/1000	Positif 1/2000	Positif 1/4000	Positif 1/8000	Total Serums
Négatif	468	14	8	0				490
Positif 1/50	9	167	98	6				280
Positif 1/200	3	17	37	6				63
Positif 1/1000			12	36	15	3		66
Positif 1/2000				13	45	9		67
Positif 1/4000					6	23	6	35
Positif 1/8000							15	15
Total Serums	480	198	155	61	66	35	21	1016 Sérums

I. F. = Immuno-fluorescence

T. L. T. = Test de Lyse

COMMENTAIRES

- Concordance sur les 1016 sérums examinés :

On a :

I. F. négatif	}	468 sérums soit 46,06 %
T. L. T. négatif		

I. F. positif	}	514 sérums soit 50,59 %
T. L. T. positif		

982 sérums ont donc été trouvés positifs (sans tenir compte du titre) ou négatif par les deux méthodes.

La concordance des deux réactions est de 96,65 %

- Si l'on tient compte des différences quantitatives on a les résultats suivants :

I. F. plus sensible que le T. L. T. :

d'un taux de dilution : 36 sérums soit 3,54 %
de 2 taux de dilution : 3 sérums soit 0,29 %
de 3 taux de dilution : 0

I. F. moins sensible que T. L. T. :

d'un taux de dilution : 48 sérums soit 4,72 %
de 2 taux de dilution : 0

Ceci montre que sur le plan quantitatif les variations portent sur un ou au maximum deux taux de dilution.

Pour l'ensemble des 1016 sérums considérés, le taux moyen est de 1/534 en Immuno-fluorescence,
de 1/478 en Test de Lyse,

ce qui traduit la sensibilité plus élevée de la réaction d'immuno-fluorescence.

- Discordances

Pour 20 sérums les résultats ont été différents suivant les méthodes ; réaction positive avec l'une, négative avec l'autre.

T. L. T. négatif au 1/50	I. F.	+ 1/200	+ 1/1000
8		8	0

soit 8 sérums (0,78 %)

I. F. négatif au 1/20	T. L. T.	+ 1/50	+ 1/200
12		9	3

soit 12 sérums (1,18 %)

Les discordances ne concernent donc au total que 1,96 % des cas.

Il faut enfin souligner que les sérums trouvés négatifs avec une technique n'étaient positifs par l'autre méthode qu'à une dilution d'écart ou au maximum à la deuxième dilution.

Dans l'ensemble, compte tenu de nos résultats, on peut donc considérer que la technique d'Immuno-fluorescence donne des résultats pratiquement superposables à ceux du Test de Lyse puisque les différences enregistrées sont pratiquement du même ordre que celles qui sont observées par une technique donnée lorsqu'on répète les examens sur un même sérum.

L'immuno-fluorescence présente en outre plusieurs avantages matériels dont le principal est incontestablement l'absence de facteur accessoire et en conséquence, la possibilité d'une standardisation beaucoup plus rigoureuse.

Ayant ainsi rendu aussi pratique que possible cette méthode et vérifié sa valeur diagnostique, nous avons utilisé la réaction d'Immuno-fluorescence pour une série de 1390 examens dans le cadre d'une enquête sérologique, mise en route à la Maternité de l'Hopital de la Croix-Rousse.

II - Enquête Sérologique effectuée sur 1390 sérums

La Toxoplasmose congénitale est une affection très importante car elle peut être responsable d'avortement, de naissance d'un enfant mort, de naissance d'un enfant vivant mais fortement atteint, ou encore d'un enfant apparemment sain, mais dont l'atteinte ne se manifesterait qu'ultérieurement.

La gravité de cette maladie est beaucoup plus grande chez le fœtus que chez l'adulte ; la date de contamination de la mère est importante à connaître, car il semble bien que c'est vers le troisième mois de la grossesse que l'infection toxoplasmique est la plus dangereuse pour le fœtus ; elle ne peut avoir lieu qu'après cette date, car il s'agit d'une placentopathie avec développement du parasite à son niveau.

En effet, HARTLEY et KATER - 1963 - ont étudié le mode d'agression du fœtus par les toxoplasmes chez des brebis enceintes de trois mois, infestées expérimentalement à ce moment. D'après ces expériences, les parasites présents dans le sang migrent à travers les villosités maternelles vers les villosités fœtales, puis passent dans la circulation sanguine du fœtus. Si on injecte une dose suffisamment élevée de toxoplasmes on obtient rapidement une infection au niveau du placenta et de l'utérus gravide. Ceci entraînera la mort du fœtus in utero.

Dans le cas où le fœtus survit à cette contamination, les toxoplasmes envahissent la plupart des organes et y créent des petites lésions nécrotiques ou inflammatoires qui ultérieurement donnent naissance à un granulome.

Tout ceci précise l'importance d'un dépistage rapide et sûr de la toxoplasmose acquise chez une femme enceinte. En effet, si l'affection maternelle est en général sans gravité, elle entraîne pour le fœtus, un pronostic fonctionnel ou vital

souvent très sombre, et nécessite la mise en oeuvre immédiate d'une thérapeutique appropriée. (Dans certains cas on a même pu envisager, au moins à l'étranger un avortement thérapeutique dans le cas de Toxoplasmose acquise chez une femme enceinte).

Pour réaliser ce dépistage sérologique il faut pouvoir disposer d'une réaction suffisamment précise et qui puisse être facilement mise en oeuvre : les contrôles doivent porter sur un nombre très élevé de cas. Ceci rend donc impossible en pratique l'emploi du Test de Lyse, que l'on ne peut utiliser sur une très vaste échelle, étant donné les difficultés rencontrées.

Différents auteurs ont donc proposé plusieurs types de réactions plus faciles à réaliser que le Test de Lyse.

Etant donné les avantages pratiques que présente la réaction d'Immuno-fluorescence, et en même temps sa valeur diagnostique sensiblement identique à celle du Test de Lyse, nous avons utilisé la réaction indirecte d'Immuno-fluorescence comme moyen de dépistage de la Toxoplasmose chez la femme enceinte.

Ce travail porte sur 1390 sérums recueillis à la Maternité de l'Hôpital de la Croix-Rousse entre le 1er octobre 1966, et le 14 juillet 1967.

Dans la quasi totalité des cas, les examens sérologiques ont été pratiqués en partant d'échantillons de sang prélevés le sixième ou le neuvième mois, ou de sang de cordon.

Durant la période considérée, 1876 femmes ont accouché à la Maternité de l'Hôpital de la Croix-Rousse. Nous avons pu contrôler la sérologie de 720 d'entre elles au sixième et au neuvième mois.

Dans le cas où l'immuno-fluorescence était positive à 1/1000 au plus, de nouveaux examens de contrôle ont été pratiqués dans la mesure du possible. Une sérologie sur sang de cordon a été effectuée dans 630 cas.

Pour l'ensemble des examens pratiqués (1390 sérums) voici quelle est la répartition en fonction des titres obtenus :

Négatif au 1/20	Positif au 1/20	+ 1/200	+ 1/1000	+ 1/2000	+ 1/4000
722	418	235	7	7	1

COMMENTAIRES

I - Les sérologies positives au 1/1000 ou plus, au troisième mois, correspondent à des toxoplasmoses anciennes datant d'avant la conception ou contemporaines à cette date. Elles ne peuvent pas contaminer le fœtus.

Nous n'avons pas eu de sérologies positives à cette date, les prélèvements sanguins n'ayant été fait que vers le sixième ou le neuvième mois dans la plupart des cas.

II - Par contre, les femmes dont la sérologie, au sixième, huitième, neuvième mois est positive au 1/1000 au plus sont susceptibles d'avoir contracté une Toxoplasmose depuis le troisième mois de la grossesse. Malheureusement, pour le lot de femmes considérées, pour des questions de difficulté de surveillance, nous n'avons pas pu avoir de sérologie au troisième mois.

Néanmoins, sur 760 femmes considérées, seulement 10 ont eu une sérologie égale ou supérieure au 1/1000.

Mois	Sérologie		
	+ 1/1000	+ 1/2000	+ 1/4000
6em	1	4	
8em	1	2	1
9em	1		

Ces résultats montrent que la fréquence de la Toxoplasmose acquise au cours de la grossesse peut être évaluée à 1,38 % environ.

- Pour les dix femmes présentant une sérologie positive au 1/1000 ou plus, nous avons étudié la sérologie du sang de cordon.

Nombre d'enfants	Sérologie du sang du cordon
9 enfants nés à terme	1 sérologie + 1/20 2 sérologies + 1/200 6 sérologies négatives
1 enfant né à 6 mois 20 jours	+ 1/1000 (pas de vérification ultérieure)

Nous avons donc neuf enfants nés à terme avec une sérologie du sang du cordon négative ou faiblement positive et un enfant né avant terme avec une sérologie positive au 1/1000. Il est cliniquement sain, mais sa naissance est trop récente et nous n'avons pas pu vérifier sa sérologie.

Nous n'osons pas en conclure que le risque pour les femmes de transmettre l'affection à leurs enfants est de 1 sur 10 soit 10 %.

III - Fréquence de la Toxoplasmose chez les enfants morts-nés

Pour compléter notre étude systématique réalisée chez des femmes enceintes nous avons effectué une enquête sérologique portant sur les enfants morts nés mis au monde à la maternité de l'Hôpital de la Croix-Rousse pendant la période considérée (1er octobre 1966 14 juillet 1967).

Au total, sur ces 28 enfants morts nés dont 10 à terme et 18 prématurément, nous avons effectué 19 sérologies (sur sang du cordon).

Les résultats sont les suivants :

Négatif	+ 1/20	+ 1/1000
17	2	1

Par conséquent, le risque de mort in utero par toxoplasmose congénitale est de 1 sur 19 soit : 5,4 %

Notre étude encore très partielle, et qui se poursuit encore actuellement à l'Hôpital de la Croix-Rousse, ne fournit que des résultats assez approximatifs étant donné le nombre relativement restreint de sujets examinés.

Bien qu'incomplète, cette étude montre cependant l'intérêt du dépistage précoce de la Toxoplasmose acquise entre le sixième et le neuvième mois. En effet, le risque d'infection toxoplasmique varie entre 0,8 et 1,38 % et pour les femmes infestées le risque d'avoir un enfant mort-né peut être évalué à 5,4 %, ce qui souligne à nouveau l'importance de la Toxoplasmose comme maladie ou comme cause de mort in utero.

EN RESUME

Ce travail a eu deux buts :

1/ - Faciliter le diagnostic direct de certaines Toxoplasmoses acquises, en particulier la Toxoplasmosé ganglionnaire.

Pouvait-on sur une ponction ou une biopsie ganglionnaire détecter, par une méthode de fluorescence ou d'immuno-fluorescence, la présence de Toxoplasmes ?

L'expérimentation sur l'animal a montré que ni un fluorochrome thérapeutique comme la Déméthylchlortétracycline, ni un antiserum conjugué n'étaient utilisables.

2/ - Le dépistage de la Toxoplasmosé congénitale présente un grand intérêt. Il permet de mettre en train un traitement antitoxoplasmique pouvant protéger le fœtus contre l'atteinte parasitaire. Or le dépistage d'une telle Toxoplasmosé nécessite au moins deux sérologies, l'une vers le troisième mois, l'autre vers le sixième mois. La sérologie classique par le Test de Lyse ne peut être appliquée sur une aussi grande échelle.

La mise au point d'une sérologie pratique, peu coûteuse était donc nécessaire.

L'Immuno-fluorescence sur antigène lyophilisé et avec contre-coloration représente certainement la technique souhaitée

CONCLUSIONS

I - POUR LE DIAGNOSTIC DIRECT DE LA TOXOPLASMOSE
(identification des toxoplasmes sur des coupes ou des applications de tissus parasités) nous avons utilisé deux fluorochromes :

1/ - Une première série de recherches a porté sur l'utilisation de la Déméthylchlortétracycline (D. M. C. T.) comme moyen de marquage des Toxoplasmes. Ce produit, en effet est actif dans la Toxoplasmose et doit à sa structure une fluorescence jaune en lumière ultra-violette.

In vitro, il provoque une légère fluorescence des parasites, par contre, administré per os à des animaux inoculés par diverses voies, il ne permet que très difficilement le repérage des parasites. sur des coupes d'organes.

2/ - Une deuxième série de recherches a porté sur l'utilisation d'un anti-sérum toxoplasmique conjugué.

Faute de pouvoir disposer de biopsie pratiquée chez l'homme et contenant des Toxoplasmes, notre étude a porté sur des animaux de laboratoire. Elle montre que les anticorps anti-toxoplasmiques conjugués avec l'isothiocyanate de fluorescéine se fixent électivement sur les parasites, qui deviennent alors fluorescents. Ceci est particulièrement net si les toxoplasmes sont entiers, par contre les résultats sont plus discutables pour les sections parasitaires souvent plus ou moins circulaires.

Nous avons pu cependant montrer que l'on pouvait pratiquer une réaction d'Immuno-fluorescence directe sur des préparations déjà colorées au May-Grunewald-Giemsa.

Dans ces conditions, l'examen anatomo-pathologique habituel

peut être complété par l'Immuno-fluorescence et cette méthode peut fournir des arguments d'appoint précieux.

Il ne semble pas que l'Immunofluorescence directe puisse, à elle seule permettre le diagnostic direct de la Toxoplasmose sur des coupes histologiques; mais nous pensons que de nouvelles améliorations techniques, portant en particulier sur la purification des conjugués, la rendraient peut-être capable de ce diagnostic.

II - POUR LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

nous avons essayé de rendre aussi précise et aussi commode que possible la réaction d'Immuno-fluorescence.

Ceci nous a conduit à étudier les conditions optimales de conservation de l'antigène : emploi d'une suspension parasitaire lyophilisée.

Par ailleurs, nous avons pu améliorer et raccourcir le temps de la réaction grâce à une contre-coloration par le bleu Evans ; il a pour but de masquer les fluorescences non spécifiques.

III - A PROPOS DE 1016 SERUMS nous avons comparé notre réaction d'IMMUNO-FLUORESCENCE au TEST DE LYSE DES TOXOPLASMES

Les deux réactions sont concordantes dans 96,65 % des cas. Des différences quantitatives ont été observées dans 8,26 % de cas ; elles n'excèdent pas un ou deux tubes de dilution.

Ce n'est que dans 1,96 % des cas que nous avons pu noter les discordances :

- Immuno-fluorescence positive)	0,78 %
- Test de Lyse négatif)	
- Immuno-fluorescence négative)	1,18 %
- Test de Lyse positif)	

IV - LA REACTION D'IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE est donc comparable au Test de Lyse des Toxoplasmes.

Elle nous parait d'un usage beaucoup plus facile, étant donné, entre autre, la possibilité d'utiliser un antigène lyophilisé.

V - Nous avons appliqué cette méthode à une ENQUETE SYSTEMATIQUE effectuée à la Maternité de l'HOPITAL de la CROIX-ROUSSE, chez des femmes enceintes au cours de la période du 1er octobre 1966 au 14 juillet 1967.

Sur 760 examens pratiqués entre le sixième et le neuvième mois de la grossesse, correspondant à 720 femmes, nous avons observé 10 sérologies positives au 1/1000 ce qui établit à 1,38 % environ le risque d'une Toxoplasmose acquise au cours de la grossesse.

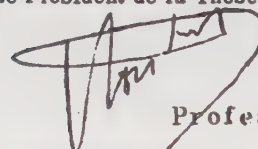
Pour ces dix cas nous avons pu pratiquer une réaction d'Immuno-fluorescence chez les dix enfants. Un seul nouveau né prématuré à six mois et vingt jours avait une sérologie positive au 1/1000 mais il ne présentait aucun signe clinique de Toxoplasmose.

Enfin, sur 28 enfants morts nés mis au monde durant la période considérée nous avons effectué 19 sérologies sur le sang du cordon. Dans un seul cas la Toxoplasmose était peut-être responsable de cette mort in utero (sérologie positive au 1/1000) bien que le parasite n'ait pu être retrouvé dans le fœtus.

VI - CES PREMIERES SERIES DE RESULTATS confirment, s'il en était besoin, l'importance de la Toxoplasmose dans la pathologie de la femme enceinte et la nécessité d'un contrôle sérologique systématique vers le troisième mois de la grossesse.

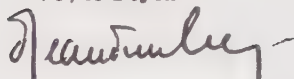
Pour la faciliter avec laquelle la réaction d'Immuno-fluorescence peut être mise en œuvre, il nous parait qu'actuellement cette sérologie devrait devenir obligatoire, comme la sérologie syphilitique. On peut même envisager qu'elle soit pratiquée en même temps, sur une seule lame, en mélangeant une suspension de Treponèmes et de Toxoplasmes.

Le Président de la Thèse :

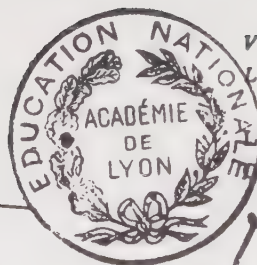


Professeur COUDERT

VU, le Doyen :



J.F. CIER



VU et permis d'imprimer

LYON, le 24 OCT. 1967

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,



R. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER W. R. M. et POTTER J. L.
Rhodamine conjugated papain as a counterstain in fluorescence microscopy.
Immunology - 1963 - 6 ; 450-452
2. AMBROISE-THOMAS P.
L'Immuno-fluorescence dans le diagnostic direct et indirect des parasitoses : applications à la Toxoplasmose.
Thèse Médecine - LYON - 1963 ; 160 p.
3. AMBROISE-THOMAS P., GARIN J. P., et Melle RIGAUD
Amélioration de la technique d'Immuno-fluorescence par l'emploi de contre-colorants. Application à la Toxoplasmose.
Presse Médicale - 1966 - 74 ; 2215-2216.
4. ANDREONI G., CURATOLO D., ROCCHI G., TOSTI U, et VELLI V.
La diagnosi serologica di Toxoplasmosi mediante il Test indirecto immunofluorescenza.
G. Mal. Infett. Parasit. - 1965 - 7 ; 144-145
5. BABUDIERI B.
Reazione per la diagnosi della Toxoplasmosi con particular riguardo alla reazione di immunofluorescenza.
G. Mal. infett. Parasit. - 1965 - 17 ; 119-125
6. BARTHE J., MANCHET, PALIARD P. et Coll.
Contribution au cytodagnostic du cancer gastrique en fluorescence.
Lyon Med. - 1965 - 214 ; 637-656.
7. BICKFORD A. A. et BURNSTEIN T.
Maintenance of "Toxoplasma gondii" in monolayer cultures of human epithelial (Hep. 2) cells.
Am. J Vet. Res. - 1966 - 27 ; 319-325.

8. BERK J. E. et KANTOR S. M.
Demethylchlortetracycline - induced fluorescence of gastric sediment. Use to differentiate benign and malignant gastric lesions.
J. Am. Med. Ass. - 1962 - 179: 997 - 1000.
9. BETZ A.
Diagnostic serologique de la Toxoplasmose au moyen d'antigènes préparés sur cultures cellulaires.
Bull. Org. Mond. de la Santé - A paraître -
10. CAMARGO M. E.
Improved technique of indirect immuno-fluorescence for serological diagnosis of Toxoplasmosis.
Rev. Inst. med. trop. Sao Paulo - 1964 - 6, N°3 ; 117-118
11. CAMARGO M. E.
Comparative evaluation of Toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin-Feldman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results.
Rev. Inst. med. trop. - Sao Paulo - 1966, 8 ; 62-68
12. CAPPONI M.
Constatations personnelles pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par l'Immuno-fluorescence.
Bull. Soc. Path. Exotique - 1966 - 1 ; 77
13. CARVER R. K., GOLDMAN M.
Staining of Toxoplasma gondii in frozen sections using fluorescein labeled antibody.
J. Parast. - 1956 - 43 (Supplément) ; 38
14. CARVER R. K. et GOLDMAN M.
Staining Toxoplasma gondii with fluorescein labeled antibody. III The reaction in frozen and paraffin sections.
Am. J. Clin. Path. - 1959 - 32 : 159-164
15. CATHIE I. A. B.
Toxoplasma adenopathy in a child with isolation of the parasite.
Lancet - 1954 - 155 ; 6829

16. COONS A. H.
Antibodies and antigens labelled with fluorescein
Schweiz Z Path. Bakt - 1959 - 22 ; 693-699

17. DALLENBACH F. et PIEKARSKI G.
Über den nachweis von "Toxoplasma gondii" in Gewebe
mit hilfe markierter fluoreszierender antikörper (Meth
nach COONS)
Arch. Path. Anat. - 1960 - 333 ; 607-618

18. DEDMON R. E., HOLMES A. W. and Fr. DEINHARDT
Preparation of fluorescein isothiocyanate-labeled gamma
globulin by dialysis, gel filtration and ion-exchange chro-
matography in combination.
J. of Bacteriology - 1965 - 89 ; N° 3 ; 734-739

19. DESMONTS G.
Diagnostic sérologique de la Toxoplasmose.
Sem. Hop. Paris - Pathologie et Biol. - 1960 - 8 ; 109-125

20. DESMONTS G.
Sérologie de la Toxoplasmose.
Annales Bil. Clin. - 1961 - 19 ; 13.-29

21. DESMONTS G.
Sur la technique de l'épreuve de lyse des toxoplasmes
(Réaction de Sabin et Feldman)
Sem. Hop. Paris (Archives de Biologie Médicale)
1955- 31 ; 193-198

22. DESMONTS G., COUVREUR J. et Ms BEN RACHID
La Toxoplasmose, la mère et l'enfant.
Archives Franc. de Pédiatrie - 1965 - 22 ; N° 10.

23. DESMONTS G.
Epidémiologie de la Toxoplasmose
Revue d'Hygiène - 1962 - 10 ; 201-217

24. FIFE E. H. et MUSCHEL L. H.
Fluorescent antibody technic for diagnostic of trypano-
soma cruzi infection.
Proc. Soc. Exp. Biol et Med - 1959 - 57 ; 540-543
25. FLETCHER S..
Indirect fluorescent antibody technique in the serology
of Toxoplasma gondii.
J. Clin. Pathol. G. B. - 1965 - 18 ; 193-199
26. FRIBOURG-BLANC A. et NIEL G.
Le diagnostic sérologique de la syphilis par la technique
d'Immuno-fluorescence.
Presse Med. - 1962 - 70 : 1875-1878.
27. FULTON J. D.
Studies on agglutination of Toxoplasma gondii
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine
and Hygiene - 1965 - 59 ; 694-704
28. GARIN J. P.
Les méthodes de laboratoire appliquées au diagnostic
de la Toxoplasmose humaine.
Rev. Hyg et Med. Soc. - 1962 - 3 ; 218-248
29. GARIN J. P.
Etude du toxoplasme et de la Toxoplasmose humaine
acquise.
Thèse Médecine - LYON - 1953 - 208 pages
30. GARIN J. P.
Note préliminaire sur l'essai de nouvelles techniques
sérologiques adaptées au diagnostic de la toxoplasmose.
Path. Biol. - 1960 - 8 ; 127-130
31. GARIN J. P. et EYLES D. E.
Le traitement de la Toxoplasmose expérimentale de la
souris par la spiramycine.
Presse Méd. - 1958 - 42 ; 957-958

32. GARIN J. P. et AMBROISE-THOMAS P.
Le diagnostic sérologique de la Toxoplasmose par la
méthode des anticorps fluorescents (technique indirecte)
Presse Med. - 1963 - 52 ; 2485-2488

33. GARIN J. P., PERRIN-FAYOLLE M. et PALIARD P.
Toxoplasmose expérimentale de la souris ; guérison clinique
et anatomo-pathologique par la Deméthylchlortétracycline.
D. M. C. T.
Presse Medicale - 1965 - 73 ; N° 10 ; 531-536

34. GARIN J. P., AMBROISE-THOMAS P. et Mme CORNET
RIGAUD A.
Technique du diagnostic sérologique de la Toxoplasmose par
immuno-fluorescence.
Feuillets de Biologie - 1967 - 8 ; N° 36 ; 19-25

35. GOLDMAN M.
Observations on some problems encountered in the routine
performance of the dye-test for toxoplasmosis.
J. Clin. Path. - 1956 - 9 ; 55-58

36. GOLDMAN M.
Staining toxoplasma gondii with fluorescein labelled anti-
body. I - The reaction in smears of peritoneal exsudate
J. Exp. med. - 1957 - 105 ; 549-556

37. GOLDMAN M.
Staining Toxoplasma gondii with fluorescent labelled anti-
body. II - A new serologic test for antibody to toxoplasma
based upon inhibition of specific staining.
J. Exp. Med - 1957 - 105 ; 557-573.

38. GOLDMAN M., GORDON M. A. et CARVER R. M.
Comparison of titers of dye and fluorescence-inhibition
tests in the serologic diagnosis of toxoplasmosis
Amer. J. Clin. Path. - 1962 - 37 ; 541-550

39. GORDON M. A., EDWARDS M. R., TOMPKINS V. N.
Refinement of fluorescent antibody by gel filtration
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1962 - 109 ; 96-99

40. GORTZ R. V., et BASSLEER J.
Un dépistage de la Toxoplasmose par le test de lyse du toxoplasme, en consultation prénatale.
Bull. Soc. Roy. Bel. de Gynec. et Obst. - 1963 - 33
197-211.

41. HALL C. T., HANSEN P. A.
Chelated azo dyes used as counterstains in the fluorescent antibody technique.
Zbl. Bakt (orig) - 1962 - 184 ; 548-554

42. HARTLEY W. J. and KATER Joan C.
The Pathology of Toxoplasma infection in the Pregnant Ewe.
Res. Vet. sci. 1963 - 4 ; 326-332

43. HELLBRUGGE
Role du placenta dans la transmission intra-utérine de la Toxoplasmose.
Congres Gyn. Obst. Genève - 1954 -

44. HIDUCHENKO K.
Tetracycline induced fluorescence. A possible diagnostic tool in bronchogenic carcinoma.
Amer. Rev. resp. Dis - 1965 - 91 : 610-612

45. HUDSON B. W.
Column absorption of fluorescein isothiocyanate labelled antibodies.
Bull. World Health org. - 1961 - 24 ; 291-292

46. HULDT G.
Acquired toxoplasmosis : Swedish experiences
VIII Congres int. de Pediatrie - Copenhague - Juillet 1956

47. HULDT G.
Experimental toxoplasmosis transplacental transmission in guinea pigs.
Acta Path. Microbiol. Scand - 1960 - 49 ; 176-188

48. HULDT G.
Experimental Toxoplasmosis. Parasitemia in guinea pigs.
Acta Path. et microbiol. Scand - 1962 - 58 ; 457-470
49. HULDT G.
Experimental Toxoplasmosis. Studies of the multiplication
and spread of toxoplasma in experimentally infected rabbits.
Acta. Path. et microbiol. Scand - 1966 - 67 ; 401-423
50. ITO S., SUZUKI K., SUTO T. et FUJITA
Immunofluorescent staining of toxoplasma in Host cells
Nat. Inst. Animal Health quart. Tokyo - 1964 - 4 ; 40-50
51. JACOBS L. et WICZER D. W.
Congenital toxoplasmosis.
Clin. Proc. Child Hosp. - 1959 - 15 ; 212
52. KELEN A. E., AYLON-LENDL J et LABZOFFSKY N. A.
Indirect fluorescent antibody method in sero-diagnosis
of toxoplasmosis.
Can J. Microbiol. (OHowa) - 1962 - 8 ; 545-554
53. KOYOMA T., KOBAYASHI A., ISHII T., KUMADA M.,
KOMIYA Y. et KOSURUE H.
Studies on toxoplasma - III The fluorescence-microscopie
observation of the parasite.
Japanese J; Parast. - 1962 - 2 ; 178-183
54. KRAMAR J., CERNA Z. et CHALUPSKY J.
Immuno-fluoreszenzreaktionen in der Serologischen
Diagnostik der Toxoplasmose.
Zent f Bakt. I. Abt. Orig. - 1964 - 193 ; 523-534
55. LELONG M. and DESMONTS G.
Sur la nature du phénomène de Sabin et Feldman.
Compt. rendu de Soc. Biol. - 1952 - 146 ; 207-209
56. LELONG M.
Rapport sur la prophylaxie de la toxoplasmose du nouveau-
né et de la femme enceinte.
Rev. Hyg. Med. Soc. - 1959 - 7 ; 71

57. LELONG M., BERNARD J., DESMONTS G. et COUVREUR J.
La toxoplasmose acquise. Etude de 227 observations.
Arch. Franç. Ped. - 1960 - 17 ; 281

58. LYCKE E. et LUND E.
A tissue culture method for titration of infectivity and
determination of growth rate of toxoplasma gondii.
Acta Path. Micorbiol. Scand. Danem. - 1964 - 60 ; 209-220

59. MARSCHALL J. D., EVELAND W. C et SMITH C. W.
Superiority of fluorescein isothiocyanate (RIGGS) for
fluorescent antibody technic with a modification of its
applications.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1958 - 95 ; 898-900

60. MANDRAS A., VANINI G. C. et CIARLINI E.
La reazione di immuno-fluorescenza per la dimostrazione
degli anticorpi contro "Toxoplasma gondii".
Igiene mod - 1962 - 56 ; 636-644

61. NAIRN R. C.
Fluorescent Protein tracing and fluorescent antibody method.
Endeavour - 1961 - 20 ; 78-84

62. NAIRN R. C.
Fluorescent protein tracing E. S. Livingtone Ltd
Edinburg and London - 1964 -

63. NICHOLS R. L. et Mc. COMB B. E.
Immunofluorescence studies with trachoma and related
antigens.
J. Immunology - 1962 - 82 ; 544-545

64. NOWOSLAWSKI A., BAZOSKO W et DYMOSKA Z.
The use of labelled antibodies in the studies on toxoplasma
gondii.
Pal. Tyg Ict. - 1962 - 17 ; 745-747

65. PETERS J. H., Mc DEWITT H.O., POLLARD L.W. ,
HARTER J. G. et COONS A. H.
Purification of fluorescent conjugate by column chroma-
tography.
Fed. Proc. - 1961 - 20 ; 17

66. PIERREUX G.
Culture de *Toxoplasma gondii* sur tissus.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop. - 1963 - 43 ; 241-246
67. RIGGS J. L., SEIWARD R. J., BURCKHALTER J. H.,
DOWN C. M. et MELTACLE T. G.
Isothiocyanate compounds as fluorescent antibody labeling agents for immuno-serums.
Am. J. Path. - 1958 - 34 ; 1081-1097
68. SABIN A. B. et FELDMAN H. A.
Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*toxoplasma*)
Science - 1945 - 108 ; 660-663
69. SADUN E. H., ANDERSON R. J. et WILLIAMS J. S.
The nature of fluorescent antibody reactions in infection and artificial immunization with *schistosoma mansoni*.
Bull. W. H. O. - 1962 - 27 ; 151-159
70. DE SARAM, KELEN A. E. et LABZOFFSKY N. A.
Comparison of serological tests in Toxoplasmosis
Canadian med. Ass. J. - 1962 - 87 ; 604-607
71. SIIM J. Chr.
Isolation of *toxoplasma gondii* from lymph nodes, tonsillar biopsies and muscular tissue, Technique and Result.
Conference on the Laboratory diagnosis of Toxoplasmosis in man and animal.
August 1959 - 24-27
72. SIIM J. Chr.
Acquired toxoplasmosis in children
IX Intern Congress of Paediatrics Montreal - 1959 -
73. SUZUKI K., SUTO T. et FUJITA J.
Serological diagnosis of toxoplasmosis by the indirect immuno-fluorescent staining.
Nation. Inst animal. Health quart Jap. - 1965 - 5 ; 73-85

74. STADTBAEDER S., TELLIER-VERHEYDEN N., et WEBER M.
Diagnostic serologique de la Toxoplasmose par l'Immuno-
fluorescence.
Acta Clinica Belgica - 1964 - 19 ; 161-166
75. TAKUMI K., TAKEBAYASHI I., TAKEUCHI H., IKEDA H.,
and TOSHIOKA N.
The use of lyophilized Parasites in indirect fluorescent
antibody technique for detection of Toxoplasma antibody.
Japan J. Microbiol. - 1966 - 10 ; 189-191
76. TOBIE J. E. and BEYE K. H.
Fluorescence of tetracyclines in filarial Worms
Proceeding of Soc. for Exp. Biol. and med. - 1960 -
104 ; 137-140
77. TSUNEMATSU Y., SHIOIRI K., et KUSONO N.
Three cases of lymphadenopathia toxoplasmatica with
special reference to the application of fluorescent anti-
body technique for detection of toxoplasma in tissue.
Jap. J. Exp. Med. - 1964 - 34 ; 217-230
78. VAN NUNEN Mc. J. et VAN DER VEEN J.
Onderzoek op Toxoplasmosis door middel van immuno-
fluorescentie.
Nederl. Tydschr. V. Geneesk - 1965 - 109 ; 742-746
79. WALTON B.C., BENCHOFF B.M. et BROOKS W.H.
Comparison of the indirect fluorescent antibody test and
methylene blue test for detection of antibodies to toxo-
plasma gondii.
Am. J. Trop. med. Hyg. - 1966 - 15 ; 149-152
80. WERY M.
Indications de l'Immuno-fluorescence dans la toxoplasmose
clinique et expérimentale.
Ann. Soc. Belge Med. trop. Parasitol. Myc. - 1965 -
45 ; 541-556

81. ZARDI O.
Gli anticorpi fluorescenti nella diagnostica per la toxo-
plasmosi.
Nuovi Ann. d'Igiene e microbiol. - 1963 - 14 ; 585-612
82. ZWAAN J. and A. F. VAN DAM.
Rapid separation of fluorescent antisera and unconjugated
dye.
Acta Histochem - 1961 - 11 ; 306-308
-

TABLE DES MATIERES

PLAN

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
DIAGNOSTIC DIRECT DE LA TOXOPLASMOSE PAR L'UTILISATION DE SUBSTANCES FLUORESCENTES OU PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE	
Introduction.....	3
I - Utilisation de la Déméthylchlortétracycline comme moyen d'identification spécifique des Toxoplasmes.....	6
- Emploi de la Déméthylchlortétracycline comme moyen de diagnostic direct ;	
a) Expérimentation in vitro.....	7
b) Expérimentation in vivo.....	7
c) Résultats	
. efficacité thérapeutique de la D. M. C. T.....	10
. intérêt comme moyen de repérage des toxoplasmes	11
. mode d'action.....	12
II - Utilisation de la Technique d'Immuno- fluorescence pour le diagnostic direct de la Toxoplasmose	
Introduction.....	13

A/ Principe de la Réaction.....	14
B/ Les éléments de la Réaction :	
I - Les différentes préparations utilisées :	
1) Le Liquide d'ascite.....	14
2) Les organes parasités.....	16
II - Le conjugué	
1) Obtention des immuns-sérums..	19
2) Conjugaison par la méthode classique.....	20
3) Purification.....	24
4) Conservation.....	25
- Etude d'une technique simplifiée mise au point à l'Institut Pasteur de Lyon.....	27
- Comparaison de la valeur de ces conjugués.....	30
III - Contre coloration.....	33
C/ Mode opératoire.....	34
D/ Résultats.....	34
CONCLUSION.....	36

CHAPITRE II

INTERET PRATIQUE DE LA REACTION D'IMMUNO- FLUORESCENCE (Technique indirecte) POUR LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

Introduction.....	38
A/ Etude expérimentale : essais d'amélioration de la technique	
I - L'antigène	

a) Origine	
. Ascite de souris toxoplas-	
miques.....	39
. Ascite de Cotton-rat.....	40
. Toxoplasmes sur cultures	
cellulaires.....	41
b) Préparation de l'antiène.....	44
. Etalements sur lame	
. Coupes à la congélation	
c) Conservation.....	45
. A + 4°C ou à - 20° C	
. Par lyophilisation	
II - Les sérums étudiés.....	47
III - Le conjugué.....	47
IV - La contre-coloration.....	49
V Installation microscopique.....	50
VI - Technique proposée.....	51
VII - Lecture des résultats.....	53
 B/ Résultats	
I - Etude de la valeur de la réaction d'immuno-	
fluorescence	
1) Comparaison IF - TLT au cours	
de la Toxoplasmose expérimentale	
sur cobaye.....	54
2) Comparaison IF - TLT à propos	
de 1016 sérums humains.....	55

II - Enquête sérologique effectuée sur 1390 sérums.....	62
RESUME.....	67
CONCLUSIONS.....	68

- TRAVAIL EFFECTUE AU LABORATOIRE
DE PARASITOLOGIE ET PATHOLOGIE
EXOTIQUE DE LA FACULTE MIXTE
DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON -

